

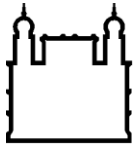
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Saúde

ANÁLISES FILOGENÉTICAS E BIOGEOGRÁFICAS EM
THYLAMYS (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)

CINTIA POVILL DE SOUZA

Rio de Janeiro
Julho de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

CÍNTIA POVILL DE SOUZA

Análises filogenéticas e Biogeográficas em *Thylamys* (Mammalia: Didelphimorphia)

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
parciais para a obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientadora: Cibele Rodrigues Bonvicino

Rio de Janeiro

Julho de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

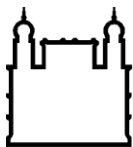
S731 Souza, Cíntia Povill de

Análises filogenéticas e biogeográficas em *Thylamys* (Mammalia: Didelphimorphia) / Cíntia Povill de Souza. – Rio de Janeiro, 2015.
xv,63 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2015.
Bibliografia: f. 52-59

1. Filogenia. 2. Biogeografia. 3. CITb. 4. VWF. 5. *Thylamys*. I. Título.

CDD 599.276



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

CINTIA POVILL DE SOUZA

ANÁLISES FILOGENÉTICAS E BIOGEOGRÁFICAS EM *THYLAMYS* (MAMMALIA: DIDELPHIMORPHIA)

ORIENTADORA: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Ana Lazar Gomes e Souza-*Presidente* (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

Prof. Dra. Lena Geise (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Salvatore Siciliano(Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz)

Prof. Dr. Paulo Sérgio D'Andrea (Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz)

Prof. Dr. Albert Rahul Eugene Antão Nobre de Menezes (Instituto Nacional de Câncer)

Rio de Janeiro, 03 de julho de 2015

Ao meu avô (em memória),
À minha Mãe e ao meu Pai,
Às minhas irmãs,
E ao Fernando.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por minha vida, pela minha profissão, pelas minhas escolhas, por tudo!

Agradeço à minha Orientadora Cibele R. Bonvicino por todo tempo que disponibilizou a mim e para as correções da dissertação, por toda paciência e apoio.

À Ana Lazar por todo apoio, por ter me auxiliado com análises, tirando dúvidas e dando sugestões, enfim, você foi muito importante no desenvolver da minha dissertação.

À Fabiana Caramaschi por todo apoio e opiniões dadas.

Ao Júlio Vilela por me receber no campus da UFRJ e me auxiliar com análises, explicações e sugestões.

Às minhas amigas do coração que conheci durante minha iniciação científica, me incetivaram antes, durante e no final desses dois anos, vocês são essenciais, Ketiuce Zukeram, Camila Braga e Raquel Watanabe.

Aos amigos que além da amizade me ajudaram e apoiaram em várias etapas tanto com informações e ajudas prestadas para auxiliar no desenvolvimento da dissertação quanto em momentos de descontração e alegria, Arina Pacheco, Diogo e Margaret Correa.

Aos amigos da Fiocruz que tive o prazer de conhecer, vocês foram muito importantes durante esse período, apoiando, aconselhando e me proporcionando momentos incríveis e de boas risadas e amizade Pilar Corrêa, Raquel Wainfas, Thiago, Luana Delfoente, Alex Maia e Juliana.

Aos amigos do laboratório do INCA, mas que são muito mais que meros colegas de laboratório, vocês são de extrema importância Morgana Lima, Maria Carolina Vianna, Pricila Spínola, Bárbara, Vanessa e Sérgio Amaro.

Ao amigo Michel por ser muito solícito a ajudar, e também por ter me proporcionado muitas risadas nas poucas vezes que nos encontramos durante esses dois anos.

Aos meus pais e irmãs pelo incentivo e muita paciência, por aturarem meu estresse e escutarem meus problemas e conquistas com a mesma destreza.

Ao meu querido Fernando pelo apoio, incentivo e todas as palavras sinceras à mim ditas, mesmo que algumas tenham sido sinceras demais (rs), vale muita à pena cada momento com você.

Ao Diogo Loretto que me ajudou com a parte final, dando dicas e ajudando na preparação de uma apresentação didática, bonita e completa.

À Dr. Alexandra por disponibilizar os tecidos das amostras de *T. karimii* que foram de extrema importância para o meu trabalho.

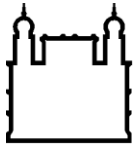
Ao Dr. João Alves por me receber na coleção de mastozoologia do Museu Nacional.

Ao Dr. Hector Seuanez por me permitir utilizar a bancada do laboratório do INCA e sequenciar minhas amostras e ao Dr. Miguel Angelo por auxiliar com algumas dúvidas.

Agradeço a FIOCRUZ por fornecer um campus maravilhoso e pesquisadores e docentes maravilhosos, todas as disciplinas foram ótimas.

Ao INCA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análises filogenéticas e biogeográficas em *Thylamys* (Mammalia:Didelphimorphia)

RESUMO

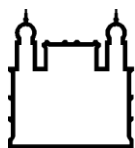
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Cíntia Povill de Souza

Thylamys é um gênero de marsupial sulamericano que a taxonomia ainda não está bem estabelecida, e o número de espécies reconhecidas variam de nove a 13, segundo diferentes autores. Pelo menos três espécies ocorrem no Brasil, *Thylamys karimii* no Cerrado e Caatinga, *T. velutinus* no Cerrado e áreas de transição, e *T. macrurus* no Cerrado. Esse trabalho teve como objetivo analisar características morfológicas diagnósticas para identificar *T. karimii*, *T. macrurus* e *T. pusillus*, realizar análises filogenéticas e biogeográficas com o marcador mitocondrial Citocromo *b* e filogenéticas com o marcador nuclear éxon 28 do fator de von Willebrand. Foram montados cariótipos de *T. karimii* e *T. venustus*, que foram comparados com os cariótipos conhecidos para as espécies de *Thylamys*. Este estudo mostrou que *T. karimii*, *T. macrurus* e *T. pusillus* possuem características morfológicas diagnósticas como: bula e forame palatal postero-lateral grandes em *T. karimii* e pequenos em *T. macrurus* e *T. pusillus*; fenestra palatina pequena em *T. karimii* e robusta em *T. macrurus* e *T. pusillus*; canal da carótida mais aberto na vista ventral em *T. karimii*, e menos aberto em *T. macrurus* e *T. pusillus*; cauda longa em *T. macrurus* e *T. pusillus*, e cauda curta em *T. karimii*; garras que ultrapassam o limite das pontas dos dedos em *T. karimii*, e não ultrapassam nas outras duas espécies. O cariótipo de *T. karimii* e *T. venustus* é $2n=14$ e $NF=20$. O $2n$ é similar em todas as espécies, mas o número fundamental dos cariótipos publicados para *T. elegans*, *T. pusillus* e *T. velutinus* diferem devido à interpretação da morfologia dos cromossomos. A morfologia do cromossomo sexual X

também pode variar entre as diferentes espécies. As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana mostram *T. karimii* e *T. velutinus* em um clado à parte do restante das espécies. A análise de datação mostrou duas radiações quase concomitantes, uma com *T. karimii* e *T. velutinus* no Cerrado e Caatinga, e a outra com o restante das espécies. Essas radiações concomitantes podem ter ocorrido no Mioceno Médio, quando houve a formação de mares epicontinentais formados após introgressão marinha e esses mares podem ter influenciado a dispersão de indivíduos do gênero *Thylamys*.

Palavras-chave: Filogenia, Biogeografia, CITb, VWF, *Thylamys*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Análises filogenéticas e biogeográficas em *Thylamys* (Mammalia:Didelphimorphia)

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTHY

Cíntia Povill de Souza

Thylamys is a marsupial genus without a well established taxonomy, with the number of recognized species varying from nine to 13 by different authors. Three of these species occur in Brazil, *T. karimii* in the Cerrado and Caatinga, *T. velutinus* in the Cerrado and transition areas, and *T. macrurus* in the Cerrado. *Thylamys karimii*, *T. macrurus*, and *T. pusillus* have diagnostic features for identification, such as bull and palatal posterior-lateral foramen large in *T. karimii* and smaller in *T. macrurus* and *T. pusillus*; small palatine fenestra in *T. karimii* and more robust in *T. macrurus* and *T. pusillus*; carotid duct more open in ventral view in *T. karimii*, in *T. macrurus* and *T. pusillus* is less open; the last species, the tail is longer than the tail *T. karimii*, shorter; *T. karimii* has claws that go beyond the limit of the fingertips and in the other two species do not exceed. The karyotype of *T. karimii* and *T. venustus* is $2n = 14$ and $NF = 20$. The $2n$ is similar to all other *Thylamys* species, whereas variation in fundamental autosome number in *T. elegans*, *T. pusillus* and *T. velutinus* are due to different interpretation of chromosome morphology. The morphology of sexual chromosome X can also vary between different species. Phylogenetic analyzes of maximum likelihood and Bayesian inference with Cytochrome *b* gene showed the clade *T. karimii* and *T. velutinus* in Cerrado and Caatinga separated of all other species. The analyses with exon 28 of von Willebrand factor were less informative due to lower sample size. The date showed two radiations, one with *T. karimii* in Cerrado and Caatinga, and another with the remaining species. These radiations can be occur in Miocene when there was

introgresion marine and the formation of epicontinental sea that can be influenced dispersion of *Thylamys* specimens.

Keywords: Phylogeny, Bigeography, CITb, VWF, *Thylamys*.

ÍNDICE

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	x
1.Introdução.....	1
1.1 Estudos citogenéticos.....	4
1.2 Estudos filogenéticos e filogeográficos.....	5
1.2.1Estudos filogeográficos.....	5
1.2.2Estudos filogenéticos.....	7
2.Objetivos.....	8
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
3.Justificativa.....	9
4.Material e métodos.....	10
4.1 Amostras.....	10
4.2 Análises morfológicas.....	13
4.3 Análises cariotípicas.....	14
4.4 Análises moleculares.....	14
4.4.1Isolamento, amplificação e sequenciamento.....	15
4.4.2Estimativas de distância genética, análises filogenéticas e filogeográficas.....	18
5.Resultados.....	21
5.1 Caracteres morfológicos.....	21
5.2 Cariótipo.....	28
5.3 Análises filogenéticas e filogeográficas.....	32
5.3.1MT-CYB.....	32
5.3.2e28-VWF.....	37
5.4 Datação.....	38
6.Discussão.....	44
6.1 Caracteres morfológicos.....	44
6.2Variação cariotípica em <i>Thylamys</i>	45
6.3 Relações filogenéticas.....	47
6.4 Considerações biogeográficas.....	48
6.5Análise de tempo de divergência.....	50
7.Conclusões.....	52

8.Referências.....	53
9. ANEXO I.....	61
10. ANEXO II.....	62

LISTAS DAS TABELAS

Tabela 1. Arranjos taxonômicos para as espécies de <i>Thylamys</i> .	1
Tabela 2. Amostras utilizadas nas análises de morfologia (MO), filogenia (FI), e cariótipo (C), com as coordenadas. M= macho, F= fêmea, BO=Bolívia, AR= Argentina, e os estados brasileiro (BR) da Bahia (BA), Piauí (PI), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), e Tocantins (TO).	11
Tabela 3. Lista dos iniciadores usados para amplificar (sublinhado) e sequenciar o <i>MT-CYB</i> e o <i>e28-VWF</i> , discriminando a sequência e posição do iniciador e a fonte (F). 1= Casado <i>et al.</i> (2010), 2= Cassens <i>et al.</i> (2000), 3= Irwin <i>et al.</i> (1991), 4= Menezes <i>et al.</i> (2010), 5=Voss & Jansa (2009).	17
Tabela 4. Condições da reação (CR) de amplificação (ampl) e sequenciamento (seq) do <i>MT-CYB</i> , e <i>e28-VWF</i> discriminando os iniciadores e temperaturas de desnaturação, amplificação e extensão em cada ciclo.	17
Tabela 5. Lista das medidas cranianas tomadas para as amostras de exemplares adultos de <i>T. macrurus</i> , <i>T. karimii</i> e <i>T. pusillus</i> , com a média, valor mínimo e máximo das medidas entre parênteses, e o tamanho amostral (n).	27
Tabela 6. Cariótipos de espécies de <i>Thylamys</i> com especificação dos números diploide (2n) e fundamental (NF), morfologia dos cromossomos sexuais feminino (X) e masculino (Y), e número (N) de exemplares cariotipados. SM= submetacêntrico, A= acrocêntrico, M= metacêntrico, ST= subtelocêntrico, D= pontual. AR= Argentina, BR= Brasil, BO= Bolívia, CH= Chile, PA= Paraguai, PE= Peru.	30
Tabela 7. Lista das haplótipos de <i>Thylamys</i> de <i>MT-CYB</i> , (<i>Hcyb</i>) e <i>e28-vWF</i> (<i>HvWF</i>), utilizadas nas análises filogenéticas, discriminando os números do GenBank (GB), a espécie e a localidade. Os estados brasileiros (BR) são Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Tocantins (TO) e Bahia (BA). PA= Paraguai, BO= Bolívia, AR= Argentina, PE= Peru, CH= Chile e, EQ= Equador.	34, 35
Tabela 8. Estimativas de distância genética com o marcador <i>MT-CYB</i> entre haplótipos de <i>Thylamys</i> com o modelo Kimura 2-parâmetros, discriminando haplótipo (H) e táxon.	36
Tabela 9. Distância genética com o marcador <i>e28-VWF</i> entre as amostras de <i>Thylamys</i> com modelo Kimura 2-parâmetros, discriminando o haplótipo (H) e o táxon.	38

LISTAS DAS FIGURAS

<p>Figura 1. Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Thylamys</i> de acordo com Gardner (2007), Carmignotto & Monfort (2006) e Carvalho <i>et al.</i> (2009). Em laranja <i>T. karimii</i>, em vermelho <i>T. velutinus</i>, em azul claro <i>T. macrurus</i>, em amarelo <i>T. pallidior</i>, em cinza <i>T. pusillus</i>, em verde escuro <i>T. venustus</i>, em verde claro <i>T. elegans</i>, em azul <i>T. Tatei</i> e em rosa <i>T. sponsorius</i>.</p>	9
<p>Figura 2. Localidades das amostras de <i>Thylamys</i> utilizadas neste trabalho. ■ = <i>T. macrurus</i>, • = <i>T. karimii</i>, ∇ = <i>T. venustus</i>, ◆ = <i>T. pallidior</i> estrela, □ = <i>T. pusillus</i>, ▲ = <i>T. sponsorius</i>, Δ = <i>T. tatei</i>, + = <i>T. elegans</i>, ◇ = <i>T. velutinus</i>. Áreas em cinza claro representam o Cerrado, em cinza intermediário a Caatinga, e em cinza escuro o Pantana. Bolívia: (1) Quillacollo; Brasil: Mato Grosso do Sul (2) Aquidauana, (3) Corumbá, (4) Dois Irmãos do Buriti, (5) Bodoquena; Goiás, (6) Luziânia, (7) Mambaí, (8) Caldas Novas, (9) Niquelândia; Tocantins (10) Palmas, (11) Rio da Conceição; Bahia (12) Jaborandi; Piauí (13) Coronel José Dias. Paraguai: (14) Concepcion. Escuela Agropecuária.</p>	12
<p>Figura 3. Vista craniana dorsal e ventral de um crânio de <i>Thylamys pusillus</i>, indicando as medidas tomadas. Para o significado das abreviações veja material e métodos. Figura adaptada de Giarla <i>et al.</i> (2010).</p>	15
<p>Figura 4. Localização aproximada dos iniciadores utilizados para amplificação (sublinhado) e sequenciamento (todos) do gene mitocondrial Citocromo b. Números abaixo do gene representam os pares de bases (1149pb).</p>	18
<p>Figura 5. Localizações aproximadas dos iniciadores utilizados neste estudo para amplificação (sublinhado) e para o sequenciamento (todos) do éxon 28 do gene nuclear Von Willebrand. Números abaixo do gene representam os pares de bases (977pb).</p>	18
<p>Figura 6. Vista dorsal, ventral e lateral dos crânios de <i>T. macrurus</i>, machos adultos (A) LBCE5704 e (B) LBCE5679, e de <i>T. karimii</i> (C) macho jovem LBCE7493, e (D) macho adulto LBCE10884. Os crânios não estão em escala.</p>	25
<p>Figura 7. Vista ventral dos crânios de <i>T. karimii</i> (esquerda) e <i>T. macrurus</i> (direita). As setas azuis indicam a bula timpânica, maior em <i>T. karimii</i> e menor em <i>T. macrurus</i>; as setas cinzas, o forame palatal posterolateral maior em <i>T. karimii</i> e menor em <i>T. macrurus</i>; as setas verdes, a fenestra palatina maior em <i>T. macrurus</i> e menor em <i>T. karimii</i>; as setas vermelhas, o canal da carótida que em <i>T. karimii</i> é maior e mais aberto que em <i>T. macrurus</i>. As escalas possuem representação de 1mm</p>	26
<p>Figura 8. Fotos de <i>Thylamys karimii</i>. Em cima fêmea CRB2967, foto de M.B. Faria, e em baixo foto de A.R. Bezerra. Notar a espessura da cauda, e seu comprimento menor ao tamanho do corpo.</p>	28
<p>Figura 9. Cariótipos em coloração convencional de (A) <i>Thylamys karimii</i> fêmea CRB2967 de Goiás, Brasil, (B) <i>T. venustus</i> fêmea LBCE5736, (C) macho LBCE5743, e (D) fêmea LBCE 5751 de Quillacollo, Bolívia. X é o cromossomo sexual feminino e Y cromossomo sexual masculino</p>	29
<p>Figura 10. Mapa com a distribuição das amostras de <i>Thylamys</i> (Tab. 4) que já tiveram seu cariótipo (2n=14) montado e/ou publicado. Em laranja</p>	31

<i>T. karimii</i> ; vermelho <i>T. velutinus</i> ; azul escuro <i>T. macrurus</i> ; verde escuro <i>T. venustus</i> (Incluindo o cariótipo de Quillacollo, neste trabalho); verde claro <i>T. elegans</i> ; cinza <i>T. pusillus</i> ; e amarelo <i>T. pallidior</i> . Os nomes nos retângulos representam as variações morfológicas do cromossomo sexual X encontradas nas espécies indicadas pelos traços.	
Figura 11. Rede de haplótipos de <i>T. macrurus</i> com o <i>MT-CYB</i> . Números de haplótipos estão listados na tabela 5. Círculos indicam haplótipos e o diâmetro indica a proporção de amostras compartilhadas e triângulos indicam vetores médios. Cinza= Aquidauana, branco= Corumbá, preto = Dois Irmãos do Buriti. Números próximos às linhas correspondem à quantidade de substituições entre os haplótipos.	32
Figura 12. Rede de haplótipos de <i>T. karimii</i> com o <i>MT-CYB</i> . Números de haplótipos estão listados na tabela 5. Círculos indicam haplótipos e o diâmetro indica a proporção de amostras compartilhadas e triângulos indicam vetores médios. Números próximos às linhas correspondem à quantidade de substituições entre os haplótipos	33
Figura 13. Topologia de ML com o <i>MT-CYB</i> para o gênero <i>Thylamys</i> . Valores próximo aos nós representam suporte de aLRT.	39
Figura 14. Topologia de IB com <i>MT-CYB</i> para o gênero <i>Thylamys</i> . Valores próximos aos nós representam suporte de probabilidade posterior.	41
Figura 15. Topologia de ML com o <i>e28-vWF</i> para o gênero <i>Thylamys</i> . Valores próximos aos nós representam suporte de Bootstrap e aLRT. * Não possui suporte para aLRT.	42
Figura 16. Topologia de IB com o <i>e28-vWF</i> para o gênero <i>Thylamys</i> . Valores próximos aos nós representam suporte de probabilidade posterior.	42
Figura 17. Árvore de tempo de divergência com o <i>MT-CYB</i> da tribo Thylamyini, enfatizando as espécies de <i>Thylamys</i> . Valores próximos aos nós representam valores de divergência estimados.	43

1. Introdução

Atualmente, os marsupiais, restritos à Oceania e ao continente americano, estão organizados em sete ordens, Didelphimorphia, Paucituberculata, Microbiotheria, Notoryctemorphia, Dasyuromorphia, Peramelemorphia e Diprotodontia (Wilson & Reeder, 2005, Gardner, 2007). Os marsupiais estão incluídos no grupo Metatheria, que agrupa os marsupiais da Austrália e do continente Americano (Deakin *et al.*, 2013; Voss & Jansa, 2009; Svartman, 2009). Este grupo está bem representado na América do Sul, América Central e México (Reig *et al.*, 1987; Gardner, 2007; Cáceres, 2012).

No Brasil ocorre apenas a ordem Didelphimorphia, que é representada pela família Didelphidae (Gardner, 2007; Cáceres, 2012). Os didelfídeos estão amplamente representados nos biomas da região neotropical (Emmons & Feer, 1990; Wilson & Reeder, 2005; Cáceres, 2008; Rossi *et al.*, 2010; Cáceres, 2012). Os didelfídeos são o grupo de marsupiais mais diversificados das Américas com cerca de 100 espécies agrupadas em 18 gêneros, sendo 97 espécies endêmicas da América do Sul (Jansa *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2010; Voss & Jansa, 2009; Gardner, 2007), e cerca de 56 espécies e 15 gêneros estão representados no Brasil.

Tate (1933), em sua revisão taxonômica baseada em morfologia, dividiu o gênero de *Marmosa* (*sensu lato*) em cinco grupos, entre eles o “grupo *elegans*” que correspondia ao então subgênero *Thylamys*. *Thylamys* Gray, 1943 foi considerado sinônimo do gênero *Marmosa* (Tate, 1933), subgênero de *Marmosa* (Gilmore, 1941), e gênero (Creighton 1984). Este último autor reconheceu que as espécies associadas ao “grupo *elegans*” faziam parte de um complexo de espécies dentro do gênero *Thylamys*. Antes apenas cinco espécies eram consideradas válidas, *T. elegans*, *T. macrura* (sic), *T. pallidior*, *T. pusilla* (sic) e *T. velutina* (sic) (Gardner e Creighton 1989). Hoje são reconhecidas entre nove e 13 espécies de *Thylamys* por diferentes autores (Carmignotto & Monfort, 2006; Voss *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2012; Giarla *et al.*, 2014; Palma *et al.*, 2014;).

Tabela 1. Arranjos taxonômicos para as espécies de *Thylamys*.

Grupo de espécies	Solari (2003)	Braun <i>et al.</i> (2005)	Carvalho <i>et al.</i> (2009)
Andino	<i>T. elegans</i> , <i>T. tatei</i> , <i>T. pallidior</i> , <i>T. venustus</i>	<i>T. elegans</i> , <i>T. tatei</i> , <i>T. pallidior</i> ,	<i>T. elegans</i> , <i>T. tatei</i> , <i>T. pallidior</i>
Paraguaio	<i>T. macrurus</i> , <i>T. pusillus</i>	<i>T. macrurus</i>	<i>T. macrurus</i>
Brasileiro	<i>T. velutinus</i>		<i>T. velutinus</i> , <i>T. karimii</i>
Yungas		<i>T. venustus</i> , <i>T. sponosrius</i>	<i>T. venustus</i> , <i>T. sponsorius</i>
Chaco		<i>T. pusillus</i>	<i>T. pusillus</i>

Cerca de 13 espécies são reconhecidas no gênero *Thylamys*, *T. citellus* (Thomas, 1912), *T. elegans* (Waterhouse, 1839), *T. fenestrae* (Marelli, 1931), *T. karimii* (Petter, 1968), *T. macrurus* (Olfers, 1818), *T. pallidior* (Thomas, 1902), *T. pulchellus* (Cabrera, 1934), *T. pusillus* (Desmarest, 1804), *T. sponsorius* (Thomas, 1921), *T. tatei* (Handley, 1957), *T. velutinus* (Wagner, 1842), *T. venustus* (Thomas, 1902) e *Thylamys* sp. (Giarla *et al.*, 2010) (Palma & Vieira (2012). No entanto há discussão sobre a validade de algumas dessas espécies (Palma *et al.*, 2014; Giarla *et al.*, 2014, Teta *et al.*, 2009). A espécie *Thylamys fenestrae* reconhecida com base em caracteres morfológicos cranianos, mandibulares e dentários por alguns autores (Martin, 2009), foi considerada sinônimo júnior de *T. pallidior* por outros (Voss *et al.*, 2009), nenhum autor comentou sobre a espécie após essas considerações. O status taxonômico de outras espécies foi questionado a partir de análises filogenéticas, sendo elas: *T. citellus* (Thomas, 1912) e *T. pulchellus* (Cabrera, 193) (Teta *et al.*, 2009), consideradas por autores como haplogrupos (A,B e C) de *T. pusillus* (Giarla *et al.*, 2010; Giarla & Jansa, 2014). Alguns autores fazem arranjos taxonômicos com as espécies do gênero *Thylamys* considerando grupos de espécies por regiões geográficas, são os grupos Paraguaio, Andino, Chaco, Yungas e Brasileiro (Tab. 1).

Thylamys foi recentemente dividido em dois subgêneros, *Thylamys* e *Xerodelphys* (Giarla *et al.*, 2010). O subgênero *Xerodelphys* inclui as espécies *T. karimii* e *T. velutinus*, que compartilham características morfológicas como: ausência ou redução de dermatóglifos (cristas papilares presentes na epiderme; Giarla *et al.*, 2010), não possuem um centro côncavo na superfície palmar (fusão entre as almofadas plantares), e cauda não preênsil menor que o comprimento da cabeça e corpo. O subgênero *Thylamys* inclui as espécies *T. macrurus* e *T. pusillus*, e foi suportada por análises filogenéticas de DNA mitocondrial. O restante das espécies foram separadas em dois grupos, (1) grupo Elegans incluindo *T. elegans*, *T. tatei* e *T. pallidior*, e (2) grupo Venustus incluindo *T. venustus* e *T. sponsorius*.

Três espécies de *Thylamys* ocorrem no Brasil, *T. karimii*, *T. macrurus* e *T. velutinus* (Fonseca *et al.*, 1996; Wilson & Reeder, 2005; Carmignotto & Monfort, 2006; Gardner, 2007; Braun *et al.*, 2005; Cáceres *et al.*, 2012). *Thylamys karimii* é encontrada em formações vegetais abertas como nos domínios do Cerrado e da Caatinga, nos estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Minas Gerais, Bahia, Piauí e Pernambuco (Carmignotto & Monfort, 2006; Gardner, 2007; Figura 1). *T. velutinus* ocorre no Cerrado e áreas de transição do Cerrado com a Mata Atlântica, sendo encontrada nos estados de Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo (Palma, 1995; Vieira & Palma, 1996; Fonseca *et al.*, 1996; Carmignotto & Monfort, 2006; Gardner, 2007; Figura 1). *Thylamys macrurus*, é encontrada no Paraguai e Bolívia, no Brasil ocorre no Cerrado, no estado do Mato Grosso do Sul (Fonseca *et al.*, 1996; Braun *et al.*, 2005; Cáceres *et al.*, 2007; Gardner, 2007; Figura 1).

Thylamys pusillus ocorre no noroeste do Paraguai, Uruguai, nordeste, região central e leste da Argentina e no sul e leste da Bolívia (Teta *et al.*, 2009; Carmignotto & Monfort, 2006), sem registro no Brasil, mas é morfológicamente similar a *T. macrurus*, com quem pode ocorrer em simpatria.

Thylamys macrurus parece ser escansorial, podendo ocasionalmente escalar árvores diferindo das outras espécies brasileiras *T. karimii* e *T. velutinus* que são cursoriais. *Thylamys macrurus* possui adaptações corporais que favorecem a escalada, como cauda e dedos mais longos em relação às outras duas espécies. Os dedos possuem grandes grânulos e dermatóglifos (Cáceres

et al., 2007) e *T. karimii* e *T. velutinus* possuem dedos e a cauda curta, os dedos tem pequenos grânulos e não possuem dermatóglifos ou esses são vestigiais.

Apesar de existirem estudos relacionados à taxonomia e filogenia do gênero *Thylamys*, há propostas diferentes quanto à classificação de suas espécies, o que o torna necessária a realização de mais estudos taxonômicos (Braun *et al.*, 2005; Gardner, 2007; Martin, 2009; Teta *et al.*, 2009; Voss & Jansa 2009; Giarla *et al.* 2010; Palma *et al.*, 2014; Giarla & Jansa, 2014).

1.1 Estudos citogenéticos

O uso de dados cariológicos tem sido muito empregado para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos a nível específico, principalmente para solucionar problemas taxonômicos de roedores. O conjunto cariológico auxilia na identificação de espécies dentro de um mesmo gênero, em que o cariótipo pode apresentar variações (Paresque *et al.*, 2004; Bonvicino *et al.*, 2005). Como o cariótipo dos marsupiais é conservado, há poucos trabalhos que analisam o complemento cromossômico de marsupiais, incluindo as espécies de *Thylamys* e outros gêneros da tribo Thylamiyni. O marsupiais didelfídeos dos gêneros *Gracilinanus*, *Thylamys*, *Marmosa*, *Marmosops*, *Caluromys* e *Metachirus* possuem cariótipos semelhantes porque compartilham o mesmo número diplóide ($2n$) de 14 (Reig *et al.*, 1972; Reig, 1977; Carvalho *et al.*, 2002; Svartman & Vianna-Morgante, 2003; Svartman, 2009). Os gêneros *Monodelphis* e *Glironia* são caracterizados por $2n=18$ (Reig & Bianchi, 1969; Reig, 1977; Carvalho *et al.*, 2002; Svartman & Vianna-Morgante, 2003; Svartman, 2009) e os marsupiais neotropicais de médio porte como *Didelphis*, *Philander*, *Chironectes* e *Lutreolina* possuem $2n=22$ (Reig, 1977; Carvalho *et al.*, 2002; Svartman & Vianna-Morgante, 2003; Paresque *et al.*, 2004; Svartman, 2009). Apesar das espécies de *Thylamys* possuírem o mesmo $2n=14$, diferentes números fundamental foram reportados para *T. elegans*, *T. pallidior* e *T. velutinus*, e essas diferenças podem conferir características próprias entre os cariótipos das espécies do gênero.

Anteriormente, o conjunto cariológico dos marsupiais com $2n=14$ eram considerados como mais plesiomórfico, porque além de ocorrerem em várias

linhagens da família Didelphidae, ocorrem em linhagens basais, como no gênero *Caluromys*, e também em linhagens das famílias em Caenolestidae e em Dasyuridae (Reig *et al.*, 1977). Atualmente, o $2n=14$ é considerado mais plesiomófico porque é encontrado em seis das sete ordens de marsupiais americanos e australianos (Deakin *et al.*, 2013).

O número fundamental autossômico (NF), e a morfologia dos cromossomos sexuais podem variar para os didelfídeos que compartilham o mesmo $2n$ (Svartman, 2009; Reig *et al.*, 1977). Dessa maneira, a maioria das espécies pode ter um cariótipo com características próprias, mesmo entre os marsupiais.

1.2 Estudos Filogenéticos e filogeográficos

1.2.1 Estudos Filogeográficos

A biogeografia surgiu para auxiliar o entendimento do padrão de distribuição dos organismos e a sua diversidade, levando em conta o espaço, o tempo e a forma (Cabrera & Wilink, 1973; Platnick & Nelson, 1977; Crisci *et al.*, 2003). A biogeografia histórica leva em conta os processos que ocorreram em grandes períodos para explicar o padrão atual de distribuição dos organismos (Crisci *et al.*, 2003). Há três fatores principais relacionados com a biogeografia: os processos de dispersão, a vicariância, e a extinção. A dispersão, simplificada, é um processo pelo qual uma população se separa da população ancestral, que pode ser em busca de alimento, abrigo e ou proteção, ultrapassando uma barreira preexistente que restringe o fluxo gênico entre as duas populações, propiciando a divergência genética entre as duas populações levando a especiação. A vicariância é um processo onde, pelo surgimento de uma barreira, ocorre a fragmentação de uma população que diverge geneticamente da sua população ancestral, levando ao surgimento de outra espécie (Platnick & Nelson, 1977).

A região Neotropical, que inclui toda a América desde o sul dos Estados Unidos até ao Estreito de Magalhães, pode ser dividida em províncias, ou domínios morfoclimáticos, ou biomas, sendo que alguns deles se caracterizam por terem predominância de formações florestais e outros de formações vegetais abertas (Ab' Sáber, 1995; Udvardy & Udvardy, 1975). O gênero

Thylamys se distribui principalmente pelo cinturão de formações vegetais abertas e secas da América do Sul, ocorrendo na Caatinga, Cerrado, Chaco, e áreas florestais adjacentes, como na Mata Atlântica. Outros táxons possuem esse padrão de distribuição como, por exemplo, as espécies *Gracilinanus agilis*, *Cryptonanus agricolai*, e *Monodelphis domestica* (Faria *et al.*, 2013; Melo & Sponchiado, 2012; Carvalho *et al.*, 2011).

Durante parte do início até o final do Cenozóico (entre o Paleoceno e o Plioceno), a América do Sul ficou isolada do restante dos continentes por barreiras oceânicas, e uma fauna de mamíferos, incluindo os marsupiais evoluiu a partir de táxons do Paleoceno (fauna original, provavelmente, proveniente da Eurásia, quando os continentes ainda estavam conectados) divergindo do restante da fauna dos outros continentes. A fauna de mamíferos foi dividida em três, *stratum I, II e III* (Simpson, 1950) e os marsupiais didefédeos foram incluídos dentro do *stratum I*, onde fazem parte os imigrantes ancestrais que adentraram ao continente Sul-Americano quando os continentes ainda estavam conectados (Simpson, 1950; Jansa *et al.*, 2013).

Na América do Sul, a Cordilheira dos Andes pode ter atuado como barreira, tanto direta quanto indiretamente (como por exemplo, a mudança no sentido de rios da região Amazônica). Os Andes evoluíram devido a esforços tectônicos, e no início do Oligoceno, o soerguimento dos Andes foi acelerado e a sua intensificação provocou mudanças ambientais e climáticas na América do Sul (Lavina & Fauth, 2013; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2013), influenciando na mudança de percurso de rios amazônicos e na formação da diagonal de áreas secas (Zanella, 2012), onde as espécies de *Thylamys* estão distribuídas

No Mioceno ocorreu uma intensificação da atividade tectônica que influenciou diretamente na diferenciação Andina e no desenvolvimento da zona sombra de chuva, com impacto sobre o clima e a biota. Durante o Mioceno médio e superior ocorreram sucessivas transgressões marinhas, a formação de mares epicontinentais que direcionaram a distribuição de parte da biota Sul-Americana (Colli, 2005; Marshall & Lundberg, 1996).

1.2.2 Estudos Filogenéticos

Um estudo filogenético com *Thylamys* mostrou *T. karimii* como a linhagem basal do gênero, seguida de um clado intermediário com *T. cinderella* e *T. venustus*, e o restante das espécies ficaram agrupadas em um clado dividido em dois, um com *T. pusillus* do Paraguai, *T. citellus* da Argentina e *T. pulchellus* da Argentina, e outro com *T. elegans* e *T. pallidior* (Teta *et al.*, 2009). Nessa análise os autores sugeriram o rio Paraná como barreira entre *T. citellus* e *T. pulchellus*, e o rio Barmejo como barreira entre *T. pulchellus* e *T. pusillus*.

Análises filogenéticas com um maior número de espécies de *Thylamys* (Palma *et al.* 2014), também observaram *T. karimii* como a linhagem basal, e *T. velutinus* (espécie que não utilizada por Teta *et al.* 2009) como linhagem intermediária entre *T. karimii* e um clado que agrupa *T. venustus* e *T. sponsorius* (considerada por alguns autores como sinônimo de *T. cinderella*, Voss & Jansa, 2009). Em seguida o clado com *T. macrurus*, o clado agrupando *T. pulchellus*, *T. citellus* e *T. pusillus*, e o restante dos táxons em um clado dividido em dois, um com *T. tatei* e *Thylamys* sp., e outro com *T. elegans* e *T. pallidior*.

Os rios podem atuar como barreiras para as espécies de *Thylamys*, como os rios que ocorrem na Cordilheira dos Andes no Chile, que atuam como barreiras entre *T. tatei* e *Thylamys* sp. (Palma *et al.*, 2014). Algumas espécies e *Thylamys* estão no início do processo de especiação entre populações, sendo separadas em haplogrupos, como as espécies andinas *T. pallidior* e *T. elegans*, cada uma dividida em dois haplogrupos (Palma *et al.*, 2014). Outros estudos também encontraram dois haplogrupos para *T. pallidior* (A e B), *T. sponsorius* (A e B), *T. venustus* (A e B), e três haplogrupos para *T. pusillus* (A, B e C; Giarla & Jansa, 2014). Nesses estudos *T. karimii* agrupada com *T. velutinus* ocupam uma posição basal, e outros dois cladros: um com *T. pallidior* e *T. elegans* agrupados a um clado com *T. tatei* e *Thylamys* sp., e o outro com *T. sponsorius* e *T. venustus* agrupados a um clado com *T. pusillus*.

Outras análises filogenéticas encontraram *T. macrurus* como a linhagem basal, seguida pelo clado *T. venustus* e *T. cinderella*, pelo clado *T. karimii* e *T. pusillus*, e pelo clado dividido em dois, subclado *T. pallidior*, e subclado *T. tatei* e *T. elegans* (Carvalho *et al.*, 2009). Outros estudos filogenéticas mostraram *T.*

velutinus como espécie basal, seguida por *T. karimii* que fica em posição intermediária entre *T. velutinus* e o clado *T. sponsorius* (A e B) e *T. venustus* (A, B e C); c clado *T. macrurus*, e o outro clado que agrupa *T. pusillus* (A, B e C) com *T. tatei*, e as espécies *T. elegans* e *T. pallidior* (A e B) agrupadas mais próximas (Giarla *et al.*, 2010).

No estudo sobre a história da diversificação dos marsupiais didelfídeos, baseado em relógio relaxado, as análises bayesianas mostram que *Thylamys* divergiu de *Lestodelphys* no Plioceno na América do Sul (Jansa *et al.*, 2013). Em seu trabalho foram utilizadas apenas quatro espécies de *Thylamys* (*T. pallidior*, *T. elegans*, *T. macrurus* e *T. sponsorius*. Voss & Jansa (2009) e Giarla *et al.* (2010) também apontam *Lestodelphys* como a linhagem da qual *Thylamys* divergiu.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo analisar as relações filogenéticas e biogeográficas das espécies de *Thylamys* com ênfase nas que ocorrem no Brasil utilizando marcadores mitocondrial e nuclear, e caracterizar aspectos da morfologia e cariologia.

Objetivos específicos

- Investigar as relações filogenéticas de *Thylamys* utilizando o gene mitocondrial Citocromo *b* (*MT-CYB*) e o marcador nuclear éxon 28 do gene von Willebrand (*e28-VWF*);
- Analisar eventos biogeográficos que podem ter influenciado a diferenciação das espécies *T. karimii*, *T. velutinus* e *T. macrurus* do restante das espécies do gênero *Thylamys*;
- Investigar a diversidade genética e a existência de estruturação geográfica em *Thylamys macrurus* e *Thylamys karimii* utilizando o *MT-CYB*;
- Analisar o cariótipo de *T. karimii* do Brasil e de *T. venustus* da Bolívia;
- Analisar qualitativamente amostras de crânios disponíveis nas coleções do LABPMR e MN/UFRJ para caracterização morfológica.

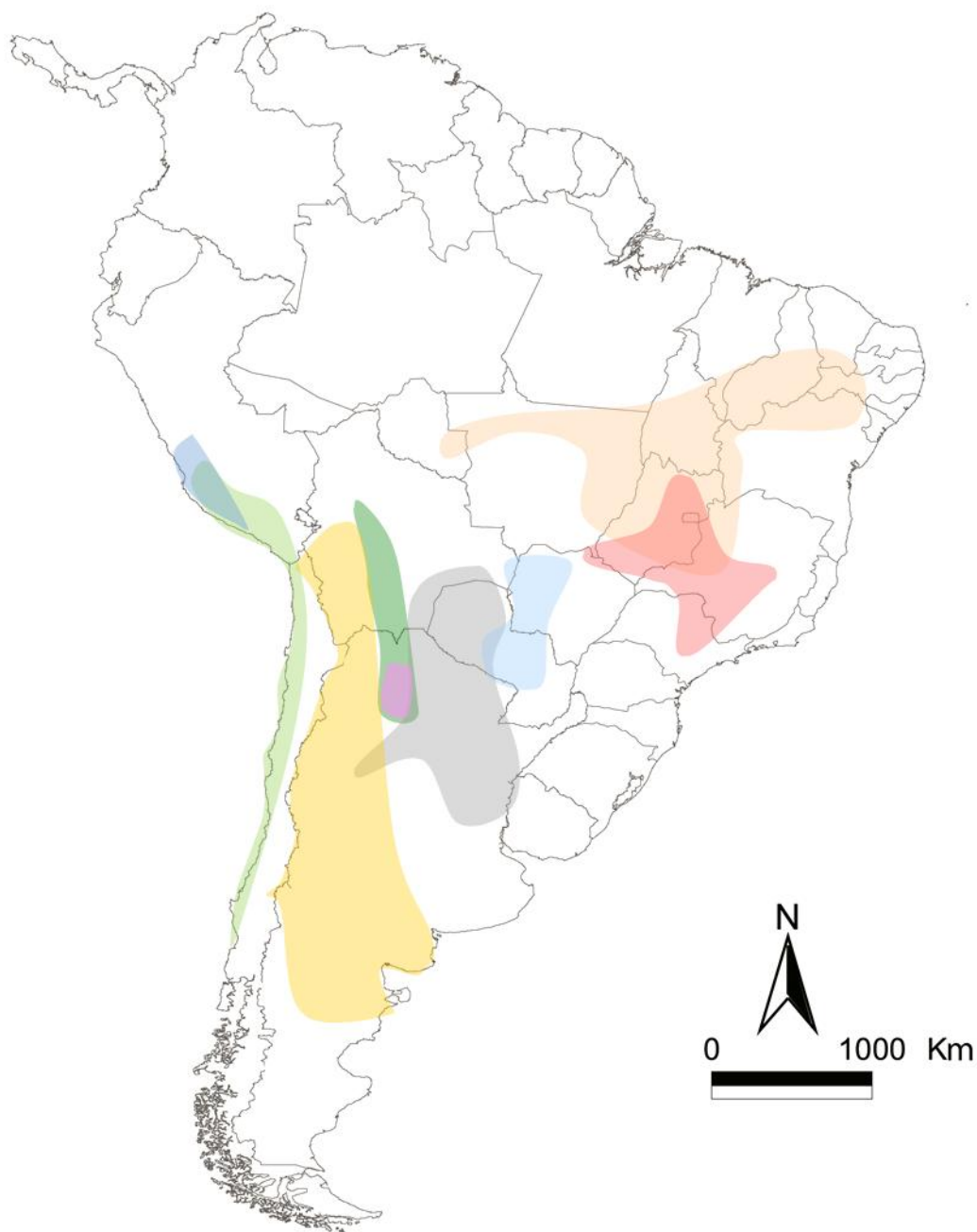


Figura 1. Mapa da distribuição das espécies do gênero *Thylamys* de acordo com Gardner (2007), Carmignotto & Monfort (2006) e Carvalho *et al.* (2009). Em laranja *T. karimii*, em vermelho *T. velutinus*, em azul claro *T. macrurus*, em amarelo *T. pallidior*, em cinza *T. pusillus*, em verde escuro *T. venustus*, em verde claro *T. elegans*, em azul *T. Tatei* e em rosa *T. sponsorius*.

3. Justificativa

Devido à problemática taxonômica e à lacuna do conhecimento sobre os membros do gênero, ainda há necessidade de estudos evolutivos, geográficos

e taxonômicos com as espécies de *Thylamys*, para melhorar o conhecimento sobre a distribuição geográfica e relações filogenéticas de suas espécies. Existem também poucos estudos que caracterizam o complemento cromossômico de espécies deste gênero, e o cariótipo de algumas espécies do Brasil ainda não foram ilustrados. Este quadro justifica mais estudos moleculares e citogenéticos e também morfológicos com amostras de *Thylamys*.

4. Material e Métodos

4.1 Amostras

Foram coletadas amostras em localidades da Bolívia e Brasil para as análises morfológicas (M), moleculares (P) e cariotípicas (C), conforme discriminado na tabela 2:

Os espécimes e as amostras de tecido hepático de *T. macrurus* e *T. karimii* estão depositados nas coleções de mamíferos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios (LABPMR), Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, algumas amostras das peles taxidermizadas de *T. macrurus* e de *T. pusillus* estão depositadas no Museu Nacional (MN), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Adicionalmente foram utilizadas amostras de tecido de *Thylamys karimii* fornecidos pela Dra. Alexandra R. Bezerra (ARB) e pela Dra. Cibele R. Bonvicino (CRB) (Fig. 2; Tab. 2).

Tabela 2. Amostras utilizadas nas análises de morfologia (MO), filogenia (FI), e cariótipo (C), com as coordenadas. M= macho, F= fêmea, BO=Bolívia, AR= Argentina, e os estados brasileiro (BR) da Bahia (BA), Piauí (PI), Mato Grosso do Sul (MS), Goiás (GO), e Tocantins (TO).

Amostra	Táxon	Localidade	MO	FI	C	Latitude, Longitude
LBCE5751 ^F , 5752 ^F , 5743 ^M , 5736 ^F	<i>venustus</i>	BO, Quillacollo,			X	-17.45, -66.25
LBCE4822 ^M , 4821 ^F , 4837 ^F , 5316 ^F , 5610 ^F	<i>macrurus</i>	BR, MS, Aquidauana, Faz. Rio Negro	X	X		-20.28, -55.47
LBCE5679 ^M , 5677 ^M , 5693 ^M , 5699 ^M , 5704 ^M , 5711 ^M	<i>macrurus</i>	BR, MS, Corumbá, Fazenda Alegria	X	X		-19.00, -57.39
MN63868 ^F , MN63896 ^F	<i>macrurus</i>	BR, MS, Corumbá, Fazenda Alegria	X			-19.00, -57.39
LBCE8795 ^M	<i>macrurus</i>	BR, MS, Dois irmãos de Buriti	X	X		-20.40, -55.17
CRB2967 ^F	<i>karimii</i>	BR, BA, Jaborandi, Região da Trisjunção,	X	X		-13.37, -44.25
LBCE1679 MN63303	<i>karimii</i>	BR, PI, Coronel José Dias		X		-8.80, -42.35
LBCE7493 ^M	<i>karimii</i>	BR, GO, Luziânia	X	X		-16.15, -47.57
LBCE10884 ^M	<i>karimii</i>	BR, GO, Mambaí	X			-14.49, -46.11
ARB354 ^M , 357 ^F	<i>karimii</i>	BR, TO, Caldas Novas		X		-17.44, -48.37
ARB617 ^F , 622 ^F , 623 ^F , 624 ^M	<i>karimii</i>	BR, TO, Palmas		X		-10.10, -48.19
MN1273	<i>pusillus</i>	AR, Resistencia	X			-27.45, -58.98

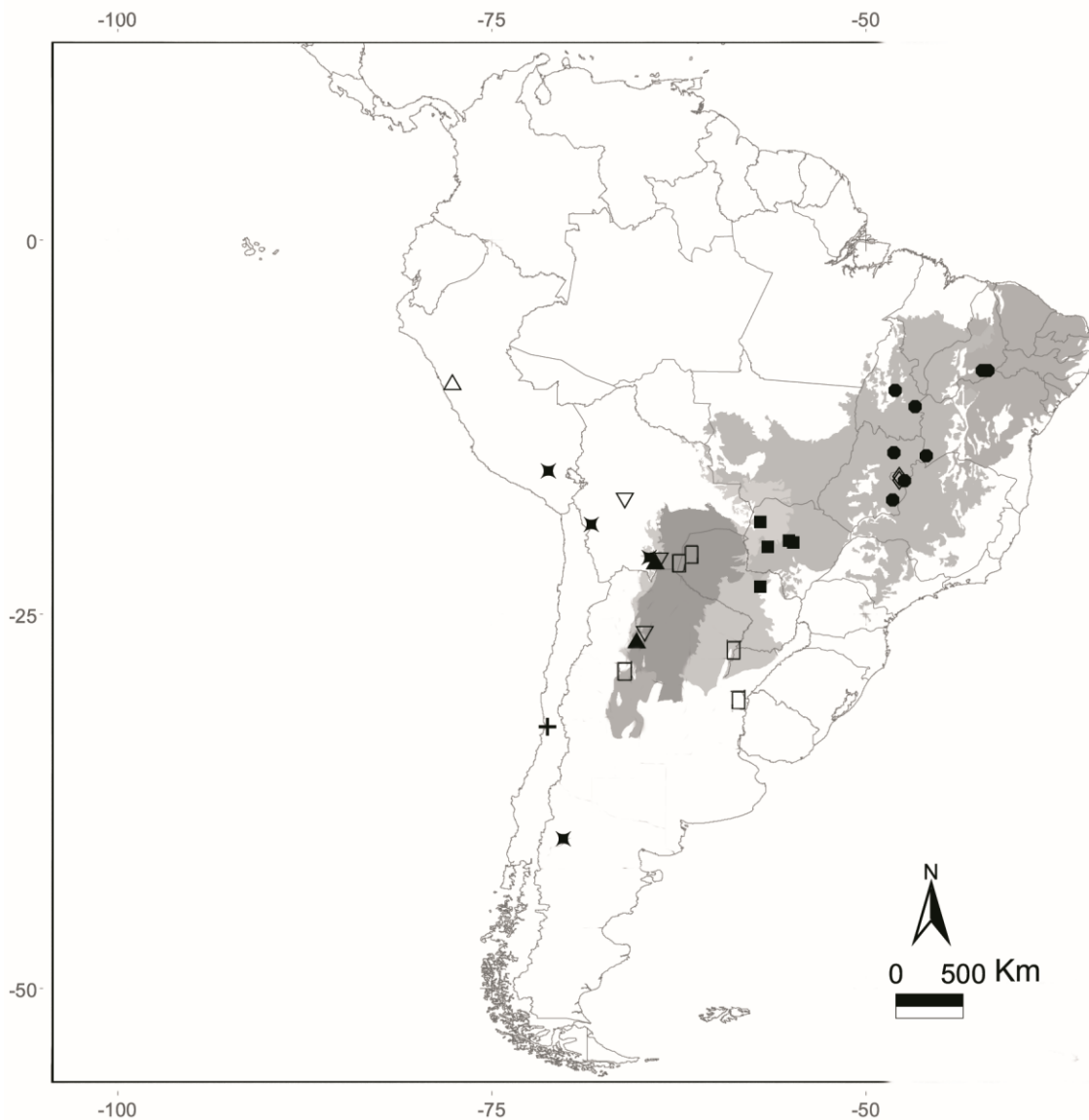


Figura 2. Localidades das amostras de *Thylamys* utilizadas neste trabalho. ■ = *T. macrurus*, ● = *T. karimii*, ▽ = *T. venustus*, ◆ = *T. pallidior estrela*, □ = *T. pusillus*, ▲ = *T. sponsorius*, △ = *T. tatei*, + = *T. elegans*, ◇ = *T. velutinus*. Áreas em cinza claro representam o Cerrado, em cinza intermediário a Caatinga, e em cinza escuro o Pantana. Bolívia: (1) Quillacollo; Brasil: Mato Grosso do Sul (2) Aquidauana, (3) Corumbá, (4) Dois Irmãos do Buriti, (5) Bodoquena; Goiás, (6) Luziânia, (7) Mambaí, (8) Caldas Novas, (9) Niquelândia; Tocantins (10) Palmas, (11) Rio da Conceição; Bahia (12) Jaborandi; Piauí (13) Coronel José Dias. Paraguai: (14) Concepcion, Escuela Agropecuária.

4.2 Análises morfológicas

Para identificação dos espécimes foram analisados caracteres do crânio e da morfologia externa (Carmignotto & Morfort, 2006; Giarla *et al.*, 2010; Voss & Jansa, 2009), e dos pelos (Carmignotto & Morfort, 2006; Quadros & Monteiro-Filho 2006), baseando-se em revisões taxonômicas do grupo. A nomenclatura dos caracteres cranianos seguiu Carmignotto & Morfort (2006) e Voss & Jansa. (2009). As medidas externas foram retiradas da etiqueta da pele.

Para as medidas cranianas utilizaram-se apenas espécimes adultos, com a estimativa de idade baseada na sequência de erupção e desgaste dos molares M1, M2, M3 e M4, e na presença do terceiro pré-molar permanente, P3 (Tribe, 1990; Astúa & Leiner, 2008). Os indivíduos adultos foram submetidos a 26 medidas do crânio e da mandíbula (Fig. 3; Voss & Jansa, 2009; Giarla *et al.*, 2010), com o auxílio de paquímetro digital de precisão 0,01mm. As medidas tomadas foram:

- (1) LN – largura do nasal, tomada dos pontos entre as suturas do maxilar com o nasal e o frontal,
- (2) LIO – largura do interorbital, menor largura,
- (3) CN – comprimento do nasal, ponto do maior eixo do nasal com o frontal até o pré-maxilar,
- (4) LAZ – largura do arco zigomático, largura máxima entre os zigomáticos,
- (5) CP – comprimento do palato, comprimento entre o pré-maxilar e o palato,
- (6) CCB – comprimento Côndilo-basal, do côndilo occipital ao pré-maxilar,
- (7) LB – largura da bula, maior largura da bula, medida diagonal,
- (8) COF – comprimento do osso frontal, comprimento entre o ponto de sutura entre o parietal com o frontal e o ponto de sutura do frontal com o nasal,
- (9) LCC - Largura da caixa craniana, largura entre um esquamosal e outro,
- (10) CCA – comprimento da caixa craniana, ponto entre a sutura com o frontal e os parietais e o occipital,
- (11) CSD - comprimento da série dentária superior, ponto entre extremidade posterior do quarto molar e a extremidade anterior do canino,
- (12) CAZ – comprimento do arco zigomático, comprimento entre o forame infraorbital e o forame subesquamosal,
- (13) LEB - largura entre as bulas,

- (14) CVC – comprimento ventral da caixa craniana, da porção posterior do palato,
- (15) LCA – largura entre os caninos,
- (16) LM1 – largura entre os primeiros molares,
- (17) LMO3 – largura entre os terceiros molares,
- (18) LM3 – largura do terceiro molar,
- (19) CM3 – comprimento do terceiro molar,
- (20) ANA - altura do nasal,
- (21) ARO – altura do rostral,
- (22) ACC - altura da caixa craniana,
- (23) CMI - comprimento dos molares inferiores,
- (24) AMA – altura da mandíbula,
- (25) CMA – comprimento da mandíbula,
- (26) CSM – comprimento da série dentária maxilar.

4.3 Análises cariotípicas

As células em suspensão foram obtidas ainda em campo a partir de cultura de duas horas de medula óssea, e estão depositadas na coleção de tecidos do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório (IOC, Fiocruz). No laboratório foram montadas lâminas a partir das células em suspensão, que depois de coradas com Giemsa 2% foram examinadas em um microscópio óptico comum. As imagens das metáfases foram capturadas com o auxílio de câmera digital acoplada ao microscópio óptico (Zeiss Imager A1), e as melhores metáfases montadas. O cariótipo foi montado com os cromossomos dispostos em ordem decrescente.

4.4 Análises moleculares

Para os genes foi adotada a nomenclatura disponível em "HUGO nomenclature gene committee", acessado em 13/05/2015.

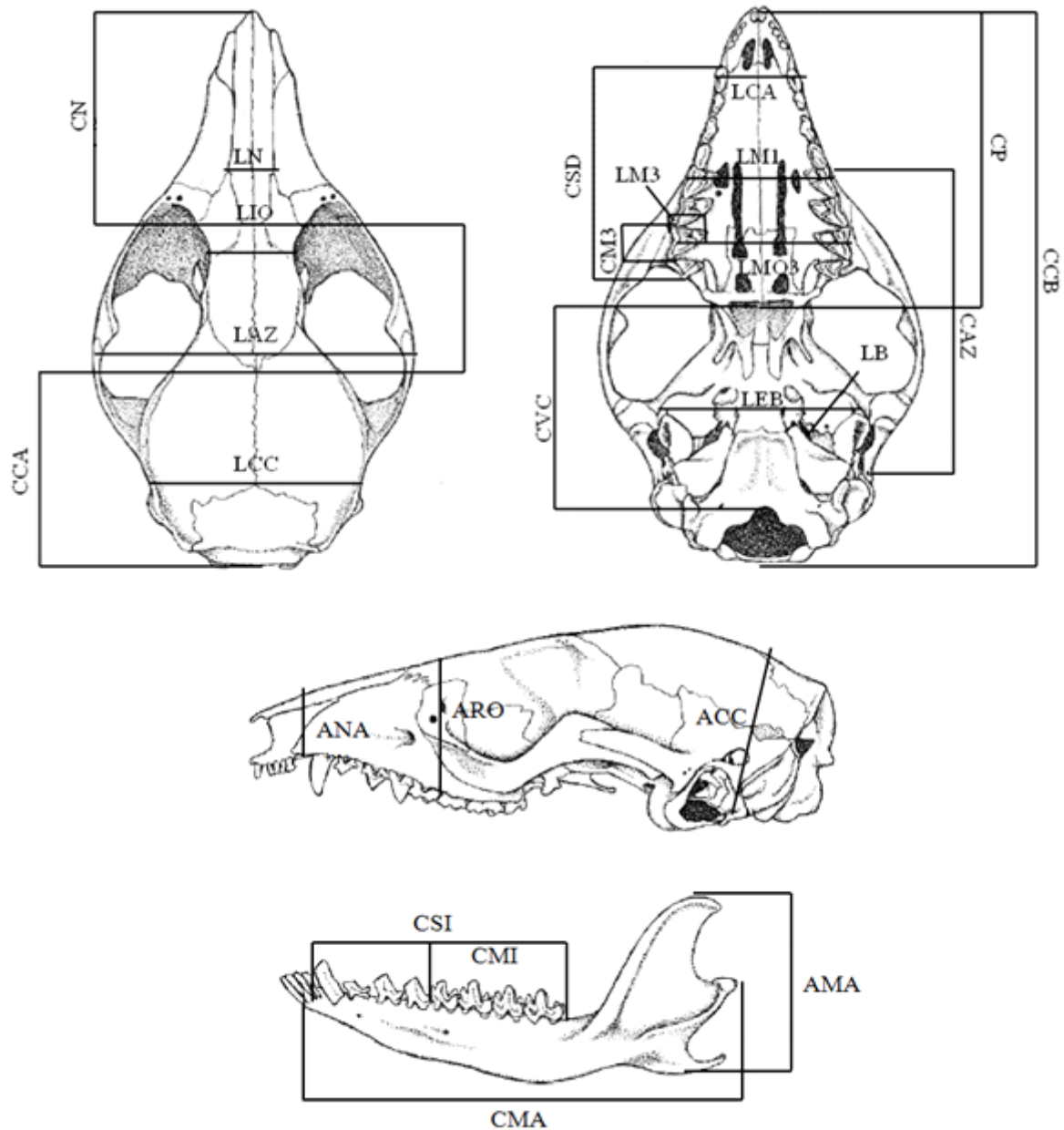


Figura 3. Vista craniana dorsal e ventral de um crânio de *Thylamys pusillus*, indicando as medidas tomadas. Para o significado das abreviações veja material e métodos. Figura adaptada de Giarla *et al.* (2010).

4.4.1 Isolamento, amplificação e sequenciamento

O DNA foi isolado a partir de amostras de tecido hepático, preservado em etanol 100% e armazenado a 4°C, pelo método fenol-clorofórmio de acordo com o protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001) com modificações

(Anexo 1). Para checar a qualidade do DNA extraído, as amostras foram corridas em um gel de agarose 0,8% e observadas em um transiluminador.

Após a extração do DNA, o gene mitocondrial Citocromo *b* (*MT-CYB*) completo (1.149 pb) e o éxon 28 (977 pb) do gene nuclear Fator de von Willebrand (*e28-VWF*) foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “polimerase chain reaction”). Foram utilizados pares de iniciadores e ciclagens específicos para cada gene (Tab. 1, 2, Figuras 4 e 5). Para confirmação da presença do amplicon, 5 µL do produto amplificado foram homogeneizados ao corante *Blue Green Loading Dye* (LGC Biotecnologia) e corrido em gel de agarose 1,5% em tampão NaOH 1x. As bandas foram visualizadas através da exposição à luz violeta em um transluminador acoplado ao programa *Quantity One*, e fotodocumentadas.

Após a corrida da eletroforese em gel de agarose, as amostras amplificadas foram purificadas utilizando o conjunto de reagentes de purificação *Illustra GFX™ PCR DNA & Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras purificadas foram corridas em gel de agarose 1,5% para observar a qualidade das bandas e observadas em um transiluminador para a realização das reações de sequenciamento.

As reações de sequenciamento foram preparadas com o conjunto de reagentes *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, seguindo a recomendação dos fabricantes utilizando os iniciadores para o *MT-CYB* (Tab. 1, Fig. 4), e para o *e28vWF* (Tab. 1, Fig. 5). O padrão de reação para todos os marcadores utilizados foi: 2 µL do produto purificado (*Template*), 1,5 µL tampão *Ready Reaction Kit*, 1,0 µL do tampão *BigDye Sequencing Buffer* (5x), 1.0 µL do iniciador (senso ou antissenso) e água deionizada para completar o volume de 10 µL. As reações foram realizadas no termociclador *Veriti 96 well* (Applied Biosystems, Tab. 2). O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems) da plataforma de sequenciamento da Divisão de Genética do Instituto Nacional de Câncer (INCA). As sequências obtidas foram editadas nos programas Chromas Pro versão 1.41 (www.technelysium.com.au/ChromasPro.html) e Chromas 1.45 (Maccarthy, 1996-1998), alinhadas no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al*, 2013).

Tabela 3. Lista dos iniciadores usados para amplificar (sublinhado) e sequenciar o *MT-CYB* e o *e28-VWF*, discriminando a sequência e posição do iniciador e a fonte (F). 1= Casado *et al.* (2010), 2= Cassens *et al.* (2000), 3= Irwin *et al.* (1991), 4= Menezes *et al.* (2010), 5=Voss & Jansa (2009).

Iniciador	Sequência	Posição	F
<u>Citb Citb rev</u>	5'GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG	antissenso	1
Citb Sot in1	5'CAYGAAACAGGATCYAAYAA	antissenso	2
Citb Sot in2	5'TGAGGACAAATATCATTYTGAG	senso	2
<u>Citb L1472</u>	5'CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG	senso	3
Citb aot	5'CATGAGGCCAAATATCATTCTGAGG	senso	4
<u>e28-vWF F104</u>	5' GGTGTGATGGAGCGTTTACACATCTC	senso	5
e28-vWF F120	5'GACTTGGCYTTYCTSYTGGATGGCTC	Senso	5
e28-vWF F557	5' CCTGGGCTACCTCTGTGACCTGGT	senso	5
e28-vWF R665	5' CTTCTAGCACAAACACCACATCCAGAACCA	antissenso	5
e28-vWF R743	5'CTCACATCCATYCGTTGCATCA	antissenso	5
<u>e28-vWF R1141</u>	5' ATCTCATCSGTRGCRGGATTGC	antissenso	5

Tabela 4. Condições da reação (CR) de amplificação (ampl) e sequenciamento (seq) do *MT-CYB*, e *e28-VWF* discriminando os iniciadores e temperaturas de desnaturação, amplificação e extensão em cada ciclo.

Marcador	CR	Desnaturação	Ciclos	Extensão
<i>MT-CYB</i>	Amp	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 50°C 30seg, 72°C 1:30min)	72°C 4min
<i>MT-CYB</i>	Seq	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 55°C 1:30min., 72°C 3min.)	72°C 4min
<i>e28-vWF</i>	Amp	95°C 5min	35 ciclos (94°C 45seg, 58°C 1min 30seg, 72°C 1:30min)	72°C 4min
<i>e28-vWF</i>	Seq	94°C 2min	35 ciclos (94°C 45seg, 55°C 1:30min, 72°C 3min)	72°C 4min

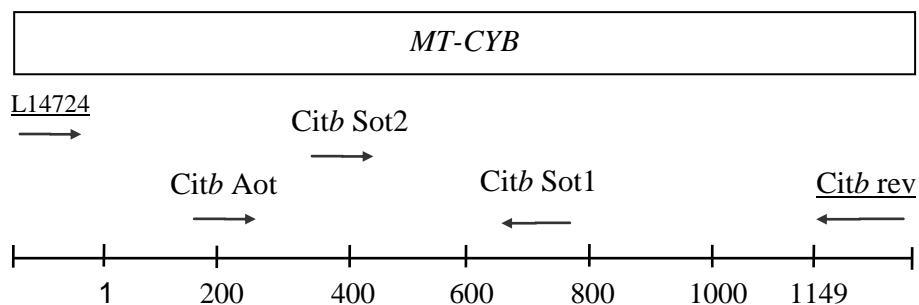


Figura 4. Localização aproximada dos iniciadores utilizados para amplificação (sublinhado) e sequenciamento (todos) do gene mitocondrial Citocromo b. Números abaixo do gene representam os pares de bases (1149pb).

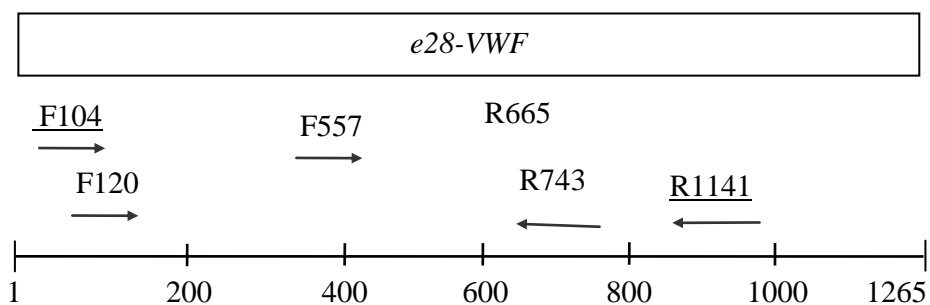


Figura 5. Localizações aproximadas dos iniciadores utilizados neste estudo para amplificação (sublinhado) e para o sequenciamento (todos) do éxon 28 do gene nuclear Von Willebrand. Números abaixo do gene representam os pares de bases (977pb).

4.4.2 Estimativas de distância genética, análises filogenéticas e filogeográficas

Para identificação dos haplótipos foi utilizado o programa DNASP versão 5.10.1 (Librado & Rozas, 2009). Para as análises de estimativas de distância genética foi utilizado o algoritmo de distância Kimura-2-parâmetros (K2p; Kimura, 1980) com programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). O modelo de substituição K2p leva em conta a diferença de frequência entre transições e transversões, assumindo frequências iguais entre os quatro nucleotídeos e que as taxas de substituições não variam entre as posições. O modelo K2p é

eficiente para avaliar a divergência genética entre grupos intimamente ligados (Tamura & Kumar, 2002), e também foi utilizado para facilitar comparações com outros estudos realizados com *Thylamys* (Giarla *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2009; Braun *et al.*, 2005).

O modelo de substituição para as análises filogenéticas do *MT-CYB* e *e28-VWF* foi escolhido pelo teste de Critério de Informação de Akaike, AIC2, do inglês “Akaike information criterion” (Akaike, 1973) com modificações (Posada & Crandall, 2001), usando o programa ModelGenerator 0.85 (Keane *et al.*, 2006). O modelo de substituição escolhido foi GTR+I+G (Rodríguez *et al.*, 1990) para o *MT-CYB*, e o modelo escolhido para o *e28-VWF* foi o K80+I (Kimura, 1980). As análises de máxima verossimilhança (MV) foram realizadas com o programa PhyML versão 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003). A confiabilidade dos ramos foi calculada por meio do teste de razão de verossimilhança aproximado (approximate Likelihood Ratio Test – aLRT) (Anisimova & Gascuel, 2006), pelo teste de reamostragem dos ramos de *Bootstrap*.

As relações filogenéticas foram também determinadas por meio de inferência Bayesiana (IB) utilizando o método de Monte Carlo - Cadeia de Markov, conjugado ao algoritmo de Metropolis (MC³) (Altekar *et al.*, 2004), usando o programa Mr.Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Foram realizadas duas corridas de 1.000.000 gerações e amostragem a cada 1000 gerações. As probabilidades posteriores (pp) foram usadas como valores de suporte para os agrupamentos.

Foi utilizado programa BEAST, versão 1.8.0 (Drummond & Rambaut, 2007), com o gene *MT-CYB*, e dois pontos de calibração associados ao tempo de separação de Thylamyini, com registro fóssil: *Thylamys pinei* (6 Ma; Goin *et al.*, 2000), e *Thylamys contrerasi* (4-15 Ma; Mones, 1980; Deschamps *et al.*, 2012). As análises de divergência foram realizadas com *priors* baseados em trabalhos anteriores (Palma *et al.*, 2014; Vilela *et al.*, 2015), onde foram utilizados os valores de maior densidade posterior (do inglês “highest posterior density”, HPD), 95% do intervalo de credibilidade, para o tempo de divergência estimado da tribo Thylamyini. A idade mínima (12,5 Ma) e média (24,9 Ma) foram retiradas do trabalho de Palma *et al.* (2014) para calibrar o tempo de divergência das análises aqui realizadas, aproximando o resultado que foi

encontrado por esses autores, já que utilizaram os mesmos fósseis para calibragem, e o valor máximo (37 Ma) foi retirado do trabalho de Vilela *et al.* (2015), pois foi o valor mais alto encontrado e estimado para a divergência da tribo thylamiyni. O programa foi utilizado para estimar a divergência estimada do gênero *Thylamys* e entre as suas espécies. Para estimar o tempo de divergência foi utilizado um *prior* de relógio molecular relaxado não correlacionado com o modelo *Yule process* de especiação (Drummond *et al.*, 2006), para considerar taxas de evolução diferentes nos diversos ramos, essas taxas podem ser calculadas independentemente através de uma distribuição dos valores de taxa de substituição de nucleotídeos. Para calibrar o tempo de divergência foi utilizada distribuição Gamma para os pontos de calibração. As estimativas da probabilidade posterior foram obtidas por amostragem MCMCMC “Metropolis-Coupled Markov Chain Monte Carlo” a cada 1000 gerações ao longo de um total de 100.000.000 gerações. Foi utilizado o programa Tracer versão 1.6 (Rambaut *et al.*, 2014) e os 10% das árvores iniciais (burn-in) foram removidas, a topologia mais suportada foi indicada usando o programa TreeAnnotator do pacote do BEAST 1.8.0.

Como grupo de fora para as análises com o marcador *MT-CYB* foram utilizados *Lestodelphys halli*, *Cryptonanus agricolai*, *Gracilinanus agilis* e *G. microtarsus*, *Marmosops incanus* e *M. paulensis* (número de acesso GenBank na tabela 5), para o *e28-VWF* foram utilizados *G. agilis*, *G. microtarsus*, *C. agricolai*, *M. incanus* e *M. paulensis* (número de acesso do GenBank na Tabela 5).

Para o cálculo e elaboração de uma rede de haplótipos foi utilizada a análise de median-joining (MJ), com o programa NETWORK 4.5.1.6 (Bandelt *et al.*, 1999) que adota o critério de parcimônia. Nesta análise foram utilizados apenas os sítios variáveis de oito sequências de *MT-CYB* de *T. karimii*, e 12 sequências de *T. macrurus*. Uma sequência de *T. karimii* (H16) disponível no GenBank pode ter sido erroneamente identificado ou sequenciada, pois apresentou uma grande diferença entre os outros haplótipos de *T. karimii*, tanto na análise de rede quanto nas análises filogenéticas com o *MT-Cyb*.

5. Resultados

5.1 Caracteres morfológicos

Thylamys macrurus

Para as análises morfológicas foram analisados 15 espécimes depositados no LABPMR e no MN.

Morfologia externa: os espécimes analisados de *T. macrurus* possuem a coloração do dorso castanha acinzentada, exceto um espécime que possuía a coloração do dorso marrom avermelhada (LBCE 8795), os espécimes apresentaram um padrão da pelagem tricolor (dorso e laterais formam três faixas longitudinais). A pelagem é dividida em três tipos: pelos guarda (aristiformes), sobrepelos (setiformes) e subpelos. No dorso os sobrepelos na região central possuem quatro bandas, base cinza (3/6), banda intermediária proximal castanha escura (1/6), banda intermediária distal creme (1/6) e banda terminal escura (1/6). Os sobrepelos das laterais do dorso são mais claros (pálidos), com pelos com a base cinza (2/4), banda intermediária creme (1/4) e banda terminal escura (1/4). Os pelos guarda da região central do dorso possuem a base cinza (1/4), banda intermediária marrom (2/4) e banda terminal escura (1/4); e nas laterais, os pelos guarda também tem um padrão de coloração com quatro bandas, com a base cinza (2/8), uma banda intermediária proximal creme (2/8), uma banda intermediária castanha (1/8), outra banda intermediária distal creme (2/8), e banda terminal escura (1/8). O ventre possui a pelagem homoganeamente creme. Máscara ocular marrom e estreita, com a pelagem entre os olhos com uma linha cinzenta com pelos de base cinza, banda intermediária creme e banda terminal escura. Na frente das orelhas e acima dos olhos, os pelos são brancos com pontas escuras, formando uma máscara. Os membros anteriores e posteriores são pálidos e com coloração da pelagem creme. Glândula gular presente em macho e fêmeas. Patas com garras curtas que atingem o limite das pontas dos dedos, e com grandes grânulos e dermatóglifos nas superfícies plantar e palmar. A cauda é maior que o comprimento da cabeça e o corpo, com pelos na base que não chegam a 1 cm. A cauda possui pelos esparsos.

Morfologia craniana: forame lacrimal grande e lateralmente exposto nas margens orbitais; palato bem fenestrado, com fenestras maxilopalatinas,

fenestras palatinas, e fenestras maxilares; forame palatal posterolateral não atinge o quarto molar; bula auditiva pequena comparada com a espécie *T. karimii*. As fenestras palatinas são maiores que em *T. karimii*. O canal da carótida é menor em relação ao da espécie *T. karimii*, a abertura do canal é no sentido do osso basioccipital. A superfície externa do jugal exibe uma concavidade na margem anterior do arco zigomático, a fossa nasolabial (Fig. 6, 7).

Morfologia dentária: Terceiro pré-molar (P3) maior que o segundo pré-molar (P2). Presença de diástema entre o primeiro e segundo incisivo. Alguns indivíduos podem apresentar cúspide acessória nos caninos.

Thylamys karimii

Para as análises externas foram analisados três espécimes, sendo um adulto e dois jovens, para analisar os caracteres cranianos e mandibulares foi analisado apenas o espécime adulto.

Morfologia externa: os espécimes de *T. karimii* possuem a coloração dorsal castanha acinzentada, mais acinzentada que em *T. macrurus* e *T. pusillus*, as laterais mais claras (ou pálidas) formando um padrão de pelagem tricolor (dorso e laterais formam três faixas longitudinais). O dorso é constituído por sobrepelos com quatro faixas, base cinza (3/6), banda intermediária proximal marrom (1/6), banda intermediária distal branca (1/6) e banda terminal escura (1/6). Nas laterais do dorso os sobrepelos possuem a base cinza (2/4), uma banda intermediária branca (1/4) e banda terminal escura (1/4). Os pelos guarda do dorso tem a base cinza (1/4), uma banda intermediária marrom (2/4) e banda terminal escura (1/4). O ventre é homogeneamente branco. A máscara ocular é marrom e estreita. Base da orelha bem alaranjada. Focinho, entre os olhos e na frente das orelhas, é mais claro em relação à pelagem da cabeça, com pelos que formam uma linha entre olhos, com base cinza, banda intermediária creme e banda terminal escura. Glândula gular presente em machos e fêmeas. As patas anteriores e posteriores possuem pelos brancos. A superfície palmar e plantar é densamente tubercular, com pequenos grânulos e sem dermatóglicos. As garras ultrapassam o limite das pontas dos dedos. Cauda mais curta que o comprimento do corpo, com pelos dispersos (Figura 8).

Morfologia craniana: forame lacrimal lateralmente exposto nas margens orbitais, palato bem fenestrado, com fenestras maxilopalatinas, fenestras palatinas, e fenestras maxilares; forame palatal posterolateral grande atingindo o protocone do quarto molar. As bulas auditórias são grandes e infladas. As fenestras palatinas são pequenas e afastadas quando comparadas com as de *T. macrurus*. O canal da carótida é maior e aberto para a vista ventral do crânio. Os arcos zigomáticos são expandidos e a superfície externa do jugal exhibe uma concavidade na margem anterior do zigomata, a fossa nasolabial (Fig. 6, 7).

Morfologia Dentária: os terceiros pré-molares do indivíduo analisado estavam ausentes. Presença de diástema entre o primeiro e segundo incisivo.

Thylamys pusillus

Para as análises morfológicas foi analisado apenas um espécime.

Morfologia externa: Pelagem dorsal acastanhada, com padrão da pelagem tricolor (dorso e laterais formam três faixas longitudinais). A pelagem do dorso é constituída por sobrepelos com quatro bandas, base cinza, banda intermediária proximal castanha, banda intermediária distal creme, e banda terminal escura. A pelagem ventral é homogeneamente creme. Máscara ocular marrom e estreita, pelagem entre os olhos é caracterizada por uma linha cinzenta com de base cinza, banda distal creme e banda terminal escura. Orelhas com a base bem alaranjada. Glândula gular presente na fêmea analisada. As patas anteriores e posteriores possuem pelagem creme e possuem garras curtas que atingem o limite das pontas dos dedos, e grandes grânulos e dermatóglifos nas superfícies plantar e palmar. Comprimento da cauda maior que o comprimento da cabeça e do corpo, cauda com pelos dispersos.

Morfologia craniana: forame lacrimal lateralmente exposto nas margens orbitais, palato bem fenestrado, com fenestras maxilopalatinas, fenestras palatinas, e fenestras maxilares; forame palatal posterolateral longo atingindo o protocone do quarto molar, mas não grande como em *T. karimii*. As bulas auditivas são pequenas como em *T. macrurus*. As fenestras palatinas são

grandes como as de *T. macrurus*. O canal da carótida possui a abertura como de *T. macrurus*.

Morfologia Dentária: P3 maior que o P2. Presença de diástema entre o primeiro e segundo incisivo.

As medidas descritivas dos crânios de *T. macrurus* e dos espécimes adultos de *T. karimi* (n=1) e *T. pusillus* (n=1) estão na tabela 3



Figura 6. Vista dorsal, ventral e lateral dos crânios de *T. macrurus*, machos adultos (A) LBCE5704 e (B) LBCE5679, e de *T. karimii* (C) macho jovem LBCE7493, e (D) macho adulto LBCE10884. Os crânios não estão em escala.

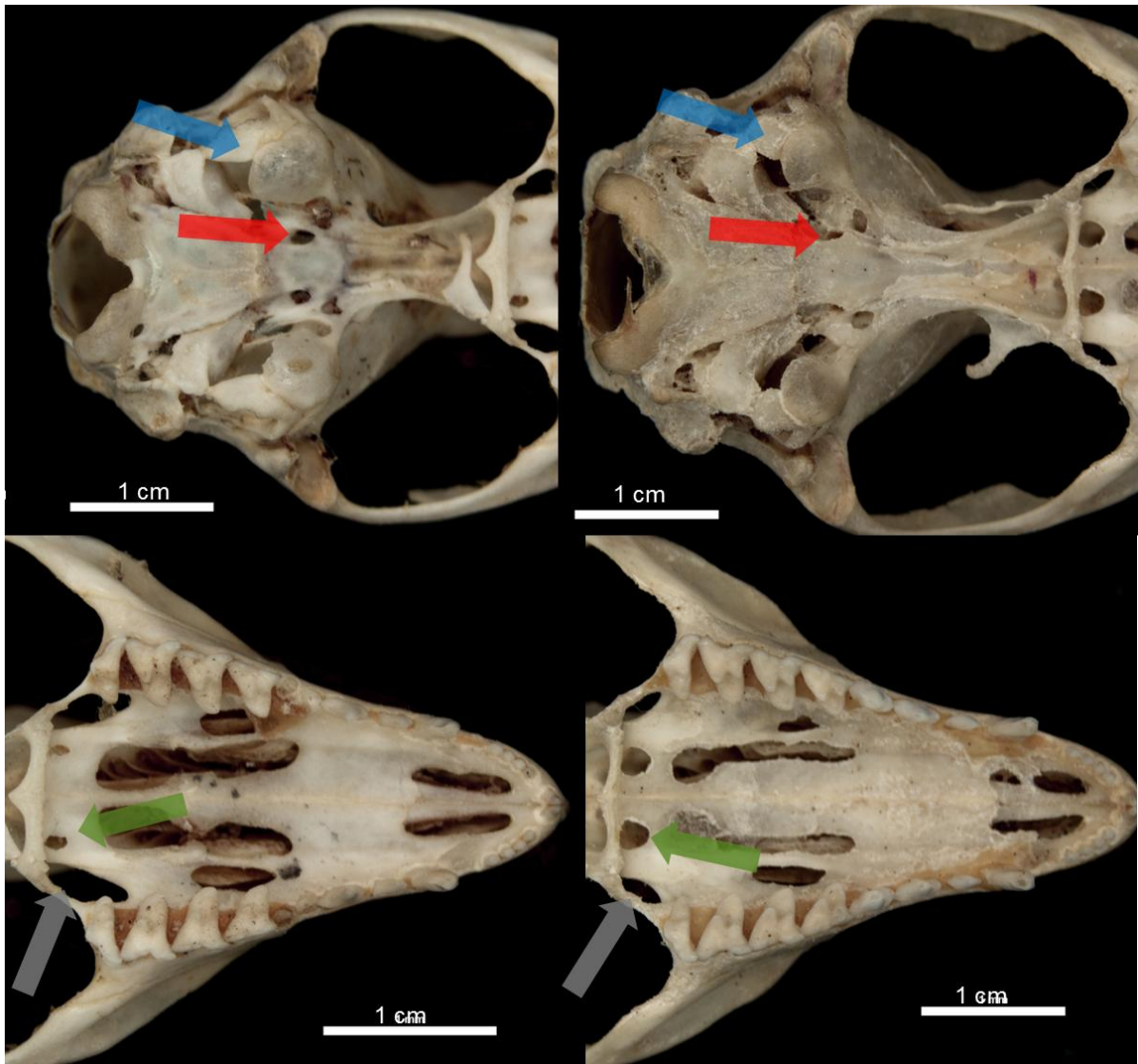


Figura 7. Vista ventral dos crânios de *T. karimii* (esquerda) e *T. macrurus* (direita). As setas azuis indicam a bula timpânica, maior em *T. karimii* e menor em *T. macrurus*; as setas cinzas, o forame palatal posterolateral maior em *T. karimii* e menor em *T. macrurus*; as setas verdes, a fenestra palatina maior em *T. macrurus* e menor em *T. karimii*; as setas vermelhas, o canal da carótida que em *T. karimii* é maior e mais aberto que em *T. macrurus*. As escalas possuem representação de 1cm.

Tabela 5. Lista das medidas cranianas tomadas para as amostras de exemplares adultos de *T. macrurus*, *T. karimii* e *T. pusillus*, com a média, e valor mínimo e máximo das medidas entre parênteses, e o tamanho amostral (n).

Medidas	Média (min.-max.)		
	<i>T. macrurus</i> (n=15)	<i>T. karimii</i> (n=1)	<i>T. pusillus</i> (n=1)
LN	3,14 (2,76-3,46)	3,39	2,34
LIO	5,09 (4,41-5,7)	4,41	4,07
CN	13,62 (9,3-14,98)	12,94	9,85
LAZ	17,97 (14,18-19,74)	17,11	14,04
CP	17,03 (14,26-17,97)	15,96	12,80
CCB	31,80 (25,5-35,52)	29,76	24,20
LB	2,96 (2,56-3,51)	3,51	2,81
COF	9,02 (8,16-10,74)	9,86	7,30
LCC	11,34 (10,46-12,14)	10,47	9,78
CCA	9,72 (8,29-10,55)	9,99	7,62
CSD	12,28(10,56-12,94)	11,26	-
CAZ	17,91 (13,65-19,91)	17,17	13,41
LEB	11,50 (9,41-12,3)	11,22	9,82
CVC	12,84 (9,32-14,62)	12,41	9,54
LCA	5,04 (3,82-5,74)	5,09	3,79
LM1	8,05 (6,66-8,9)	8,10	6,39
LMO3	9,57 (7,93-10,2)	9,22	7,46
LM3	2,69 (2,2-2,9)	2,38	2,31
CM3	1,87 (1,35-2,04)	1,66	1,74
ANA	4,07 (3,39-4,55)	4,14	3,17
ARO	8,04 (6,17-8,71)	7,30	6,24
ACC	8,15 (7,45-8,73)	8,15	6,75
CM1	7,0 (6,19-7,31)	6,32	5,71
AMA	9,44 (7,38-10,34)	8,86	7,16
CMA	23,75 (18,36-25,87)	21,92	17,38
CSI	13,02 (11,1-13,84)	11,72	10,54



Figura 8. Fotos de *Thylamys karimii*. Em cima fêmea CRB2967, foto de M.B. Faria, e em baixo foto de A.R. Bezerra. Notar a espessura da cauda, e seu comprimento menor ao tamanho do corpo.

5.2 Cariótipo

Foram analisadas amostras de uma fêmea de *T. karimii* (CRB 2967) do Brasil, e três fêmeas (LBCE 5736, 5751 e 5752) e um macho (LBCE5743) de *T. venustus* da Bolívia (Fig. 9). As preparações citológicas com técnica de coloração convencional mostraram $2n=14$ e $NF=20$ para *T. venustus* e *T. karimii* (Fig. 9, Tab. 4). O complemento autossômico se caracteriza por seis pares de cromossomos, sendo três pares submetacêntricos grandes, um par metacêntrico de médio a grande, e dois pares subtlocêntricos médios. O cromossomo sexual feminino (X) é um metacêntrico pequeno em *T. karimii* e um submetacêntrico pequeno em *T. venustus*. O cromossomo sexual masculino (Y) é um acrocêntrico pequeno em *T. venustus*.

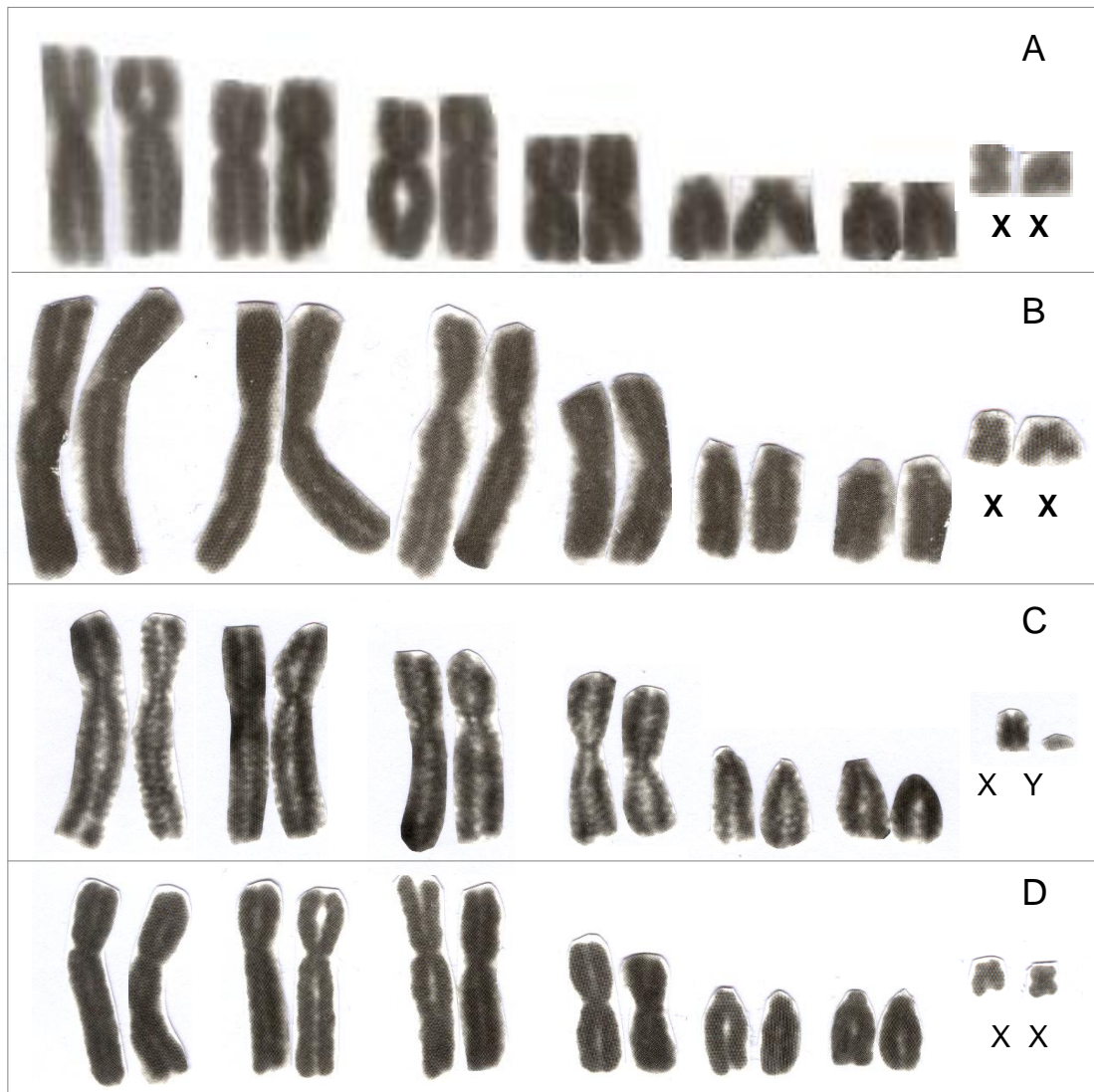


Figura 9. Cariótipos em coloração convencional de (A) *Thylamys karimii* fêmea CRB2967 da Bahia, Brasil, (B) *T. venustus* fêmea LBCE5736, (C) macho LBCE5743, e (D) fêmea LBCE 5751 de Quillacollo, Bolívia. X é o cromossomo sexual feminino e Y cromossomo sexual masculino

Tabela 6. Cariótipos de espécies de *Thylamys* com especificação dos números diploide (2n) e fundamental (NF), morfologia dos cromossomos sexuais feminino (X) e masculino (Y), e número (N) de exemplares cariotipados. SM= submetacêntrico, A= acrocêntrico, M= metacêntrico, ST= subtelo-cêntrico, D= pontual. AR= Argentina, BR= Brasil, BO= Bolívia, CH= Chile, PA= Paraguai, PE= Peru.

Táxon	Táxon no original	N	2n	NF	X	Y	Localidade	Referência
<i>T. sponosrius</i>	<i>T. cinderella</i>		14	20	A	-	AR: Jujuy, Depto El Carmen	Braun <i>et al.</i> (2005)
<i>T. elegans</i>	<i>T. elegans</i>		14				CH: região central	Page <i>et al.</i> (2003)
<i>T. elegans</i>	<i>Marmosa (T.) elegans</i>	3	14	24*	SM	D	CH: Aconcagua, 3km S Cachagua	Reig <i>et al.</i> (1972)
<i>T. elegans</i>	<i>Marmosa elegans</i>	6	14	22*	SM		CH: Aconcagua, Cachagua	Reig (1977)
<i>T. elegans</i>	<i>T. elegans</i>	5	14	24*	A	D	CH: Coquimbo, Los Hermaños de Pichidanguí	Fernandez-Donoso <i>et al.</i> (1979)
<i>T. elegans</i>	<i>T. elegans</i>	9	14	20	ST	-	CH: Río Loa, Pichidanguí, Las melosas	Spotorno <i>et al.</i> (1997)
<i>T. kariimii</i>		1	14	20	M	-	BR: Bahia, Jaborandi	Este estudo
<i>T. karimii</i>	<i>T. karimii</i>	11	14	20	-	-	BR: Piauí, E.E. Uruçuí-Una; Minas Gerais, PN Grande Sertão Veredas	Carmignotto <i>et al.</i> (2006)
<i>T. macrurus</i>	<i>T. macrurus</i>	1	14	20	A	-	PA: Concepción, Concepción	Palma (1995);
<i>T. pallidior</i>	<i>T. pallidior</i>	5	14	20	A	-	BO: Dept Chuquisaca, Camargo, Dept Tarija, Serranía Sama.	Palma (1995)
<i>T. pallidior</i>	<i>T. pallidior</i>	4	14	20	A	-	BO: Dept Chuquisaca, Camargo	Palma & Yates (1996)
<i>T. pusillus</i>	<i>T. pusillus</i>	3	14	20	SM		BO: Dept Tarija, Estancia Bolívar	Palma & Yates (1996)
<i>T. pusillus</i>	<i>Marmosa pusilla</i>	4	14	24	SM		AR: Buenos Aires, Vivero Chasico	Reig (1977)
<i>T. pusillus/</i> <i>T. venustus</i> **	<i>T. elegans</i>		14	20	SM	A	BO: Tarija	Shchipanov <i>et al.</i> (1996)
<i>T. sponsorius</i>			14	20	A	-	AR: Províncias de Catamarca, Salta, Tucumán	Braun <i>et al.</i> (2005)
<i>T. velutinus</i>	<i>T. velutinus</i>	2	14	24*	SM	A	BR: Goiás, Niquelândia	Carvalho <i>et al.</i> (2002)
<i>T. venustus</i>		4	14	20	SM	A	BO: Quillacollo, Cotachi	Este estudo
<i>T. venustus</i> ***	<i>T. elegans</i> ***	3	14	20	A	-	BO: Dept Cochabamba, Tinkusiri, Dept Santa Cruz, Vallegrande	Palma & Yates (1996)

* a morfologia de dois pares do complemento autossômico é de subtelo-cêntricos, o que, segundo nossa interpretação, resultaria em um NF=20. Carvalho *et al.* (2002) classificam estes dois pares como "submeta-telo-cêntricos";

** *T. elegans* não ocorre na Bolívia, baseado na localidade poderia ser um exemplar de *T. venustus* ou *T. pusillus*;

*** Palma *et al.* (2002) reclassificam o exemplar NK23952 e NK 22844, NK22986 como *T. venustus*.

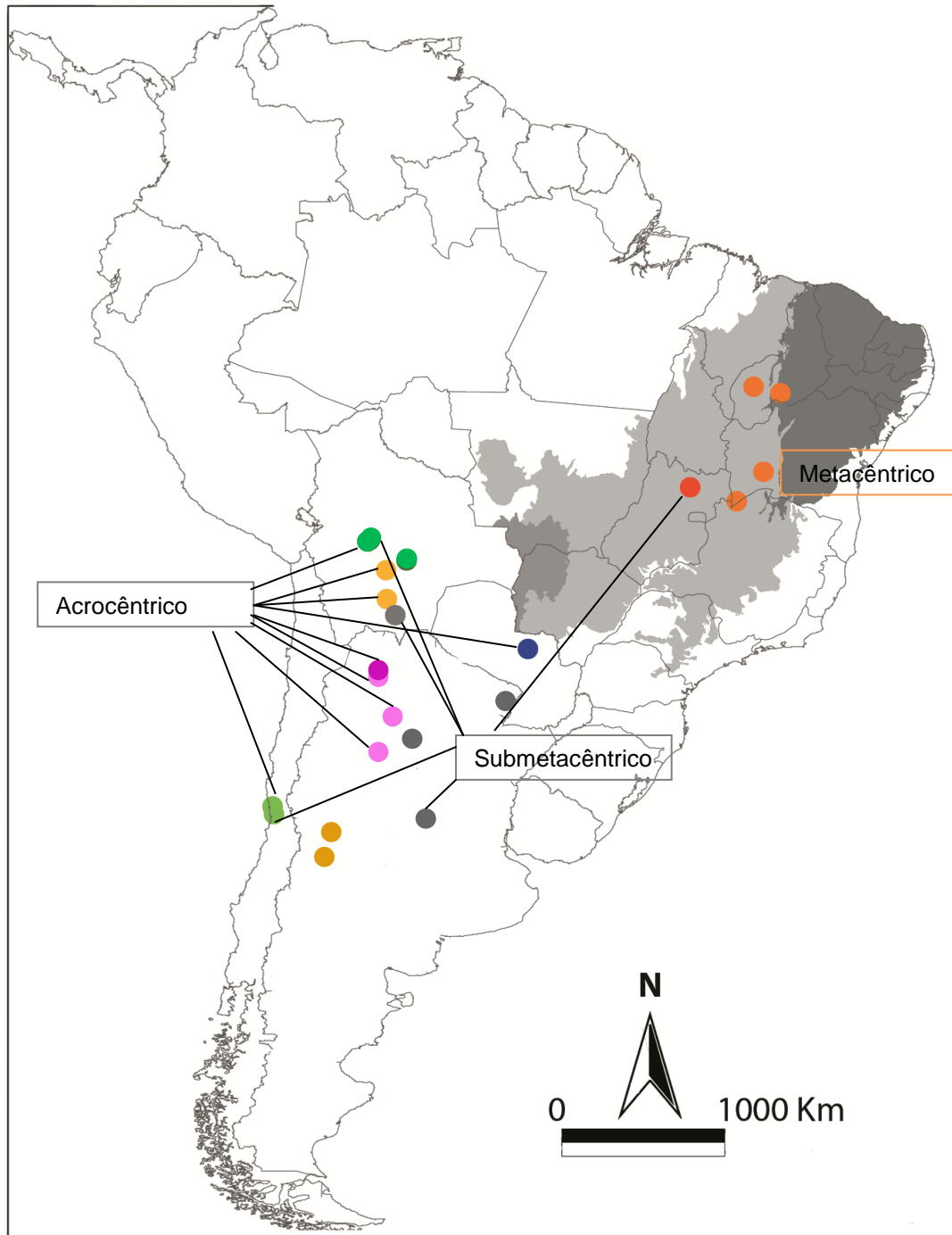


Figura 10. Mapa com a distribuição das amostras de *Thylamys* (Tab. 4) que já tiveram seu cariótipo ($2n=14$) montado e/ou publicado. Em laranja *T. karimii*; vermelho *T. velutinus*; azul escuro *T. macrurus*; verde escuro *T. venustus* (Incluindo o cariótipo de Quillacollo, neste trabalho); verde claro *T. elegans*; cinza *T. pusillus*; amarelo *T. pallidior*, rosa claro *T. sponsorius*, e em rosa escuro *T. cinderella*. Os nomes nos retângulos representam as variações morfológicas do cromossomo sexual X encontradas nas espécies indicadas pelos traços.

5.3 Análises Filogenéticas e filogeográficas

5.3.1 MT-CYB

O sequenciamento completo do *MT-CYB* (1149 pb) de 20 amostras de *Thylamys*, 12 de *T. macrurus* e oito de *T. karimii*, mostrou nove haplótipos para *T. macrurus*, e cinco para *T. karimii* (Tab. 5). As estimativas de distância genética intraespecíficas de *T. macrurus* variaram e 0 a 1,2, e as de *T. karimii* variaram de 0 a 2,2 (Tab. 6).

A análise de rede com as sequências de *T. macrurus* mostrou um vetor médio separando a população de Aquidauana-Corumbá-Dois Irmãos de Buriti do haplótipo de Bodoquena e do Paraguai, com poucas alterações entre os haplótipos do primeiro grupo (1 a 3), e pelo menos oito alterações separando os haplótipos deste grupo daqueles de Bodoquena e do Paraguai (Fig. 11).

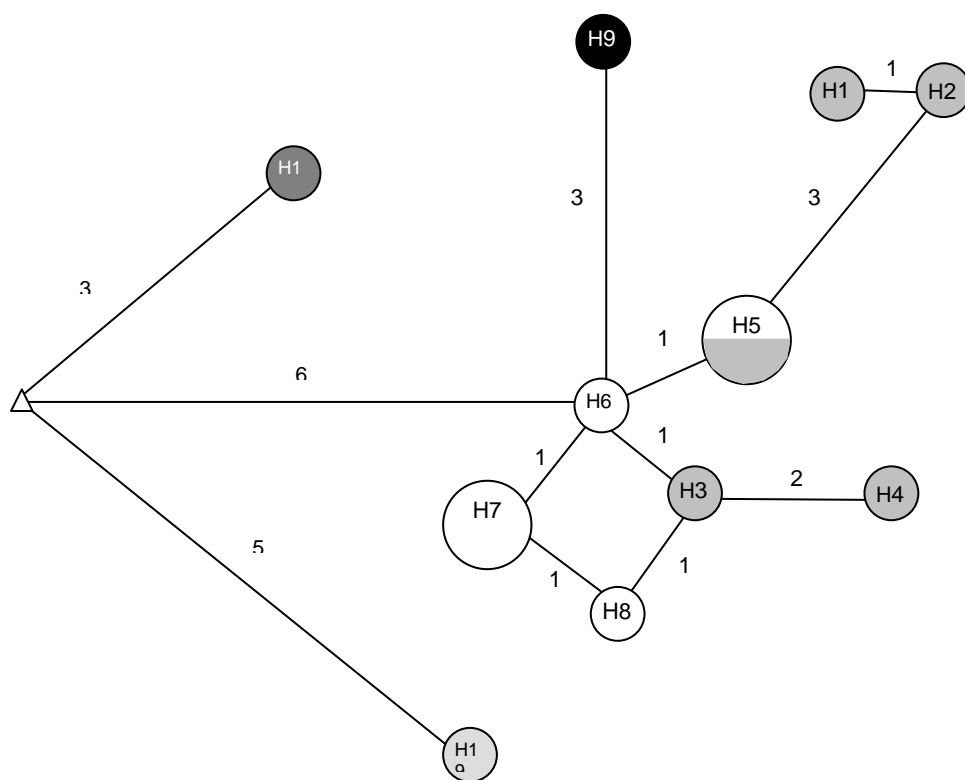


Figura 11. Rede de haplótipos de *T. macrurus* com o *MT-CYB*. Números de haplótipos estão listados na tabela 5. Círculos indicam haplótipos e o diâmetro indica a proporção de amostras compartilhadas e triângulos indicam vetores médios. Cinza= Aquidauana, branco= Corumbá, preto = Dois Irmãos do Buriti. Números próximos às linhas correspondem à quantidade de substituições entre os haplótipos.

A análise de rede com os haplótipos de *T. karimii* mostrou vários vetores médios, com pelo menos um vetor separando cada haplótipo (Fig. 12).

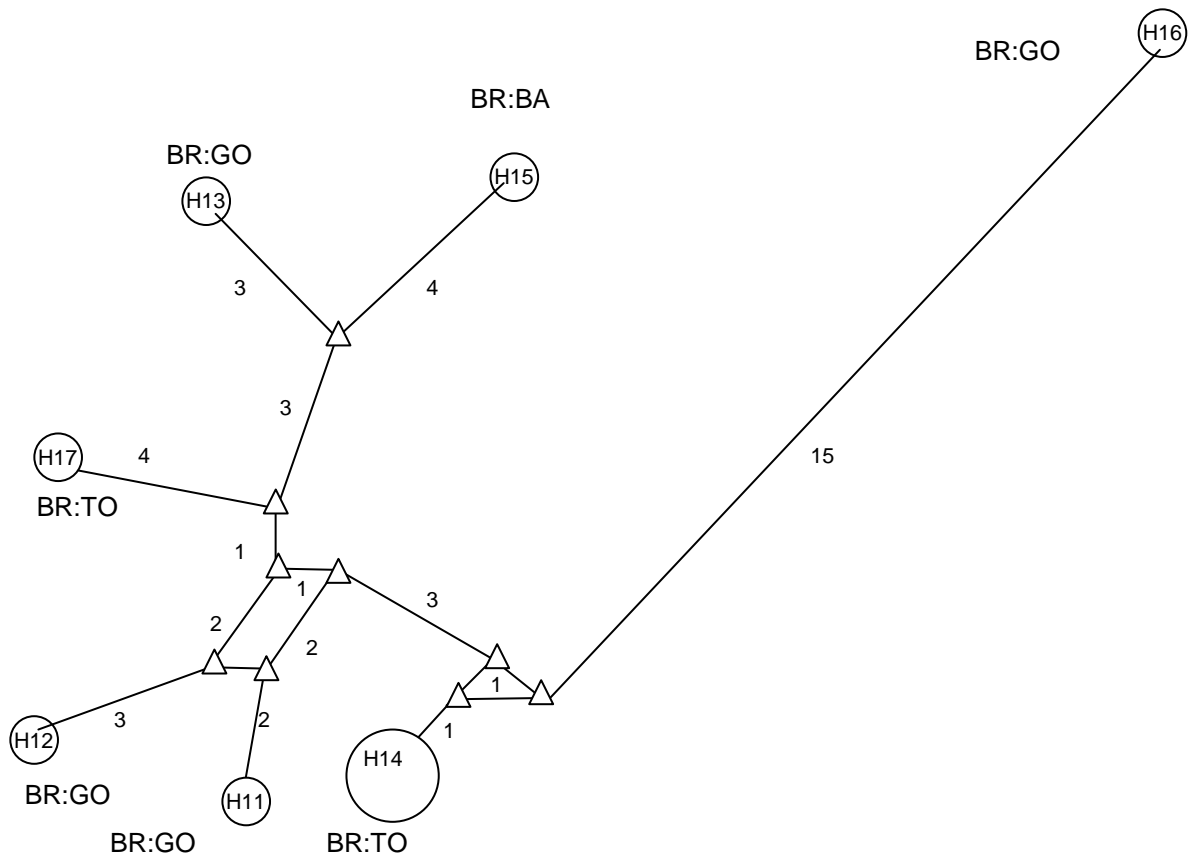


Figura 12. Rede de haplótipos de *T. karimii* com o *MT-CYB*. Números de haplótipos estão listados na tabela 5. Círculos indicam haplótipos e o diâmetro indica a proporção de amostras compartilhadas e triângulos indicam vetores médios. Números próximos às linhas correspondem à quantidade de substituições entre os haplótipos.

Tabela 7. Lista das haplótipos de *Thylamys* de MT-CYB, (Hcyb) e e28-vWF (HvWF), utilizadas nas análises filogenéticas, discriminando os números do GenBank (GB), a espécie e a localidade. Os estados brasileiros (BR) são Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), Goiás (GO), Tocantins (TO) e Bahia (BA). PA= Paraguai, BO= Bolívia, AR= Argentina, PE= Peru, CH= Chile e, EQ= Equador.

Hcyb(GB)	HvWF(GB)	Amostra	Taxon	Localidade
H1	H1	LBCE4821 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR:MS, Aquidauana
H2	H1	LBCE4822 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Aquidauana
H3	H1	LBCE4837 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Aquidauana
H4	H1	LBCE5316 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Aquidauana
H5	H1	LBCE5610 ^P	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Aquidauana
H5	H1	LBCE5679 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H6	H1	LBCE5677 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H7	H2	LBCE5693 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H7	H1	LBCE5704 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H7	H1	LBCE5711 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H8	H1	LBCE5699 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Corumbá
H9	H1	LBCE8795 ^{M,P}	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Dois irmãos do Buriti
	H3	MN63303 (LBCE1679) ^{P,M}	<i>T. karimii</i>	BR:PI, Coronel José Dias
H11	H3	LBCE7493 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: GO, Luziania
H12	H3	ARB354 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: GO, Caldas Novas
H13	H3	ARB357 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: GO, Caldas Novas
H14	H3	ARB617 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: TO, Palmas
H14	H3	ARB622 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: TO, Palmas
H14	H3	ARB623 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: TO, Palmas
H14	H3	ARB624 ^P	<i>T. karimii</i>	BR: TO, Palmas
H15	H3	CRB2967 ^{M,P,K}	<i>T. karimii</i>	BR: BA, Jaborandi
H16 EF051700	-	-	<i>T. karimii</i>	BR: GO, Niquelândia
H17 HM583381	-	APC 1561	<i>T. karimii</i>	BR: TO, Rio d Conceição
H18 HM583383	-	NK27536	<i>T. macrurus</i>	PA:Concepcion,Escuela agropecuária
H19 HM583382	-	APC932	<i>T. macrurus</i>	BR: MS, Bodoquena
-	H1 FJ159366	NK27536	<i>T. macrurus</i>	PA: Concepción,Escuela agropecuaria
H20 HM583419	-	TK66476	<i>T. pusillus</i>	PA: Boquerón, P Nteniente Enaso
H21 HM583417	-	NK25141	<i>T. pusillus</i>	BO: Tarija, Estancia Bolivar
-	H4 FJ159368	NK 25139	<i>T. pusillus</i>	BO: Tarija, Estancia Bolívar
H22 HM583374	-	LTU539	<i>T. citellus</i>	AR: Entre Rios, Estancia Sta Ana de carpinchorí
H23 HM583499	-	NK30761	<i>T. venustus</i>	BO: Tarija, Tapequa
H24 HM583478	-	OCGR3553	<i>T. venustus</i>	AR: Tucumán, Los Chorillos
-	H5 FJ59369	BDP 3345	<i>T. venustus</i>	BO: Tarija, Chuquisaca
H25 HM583449	-	MVZ135504	<i>T. tatei</i>	PE: Ancash
H26 HM583431	-	OCGR3929	<i>T. sponsorius</i>	AR: Tucumán
H27 HM583446	-	NK23904	<i>T. sponsorius</i>	BO: Tarija
H28 HM583413	-	UP397	<i>T. pallidior</i>	AR: Neuquén,Cerrito Piñón,Estancia Collon Cura
H29 HM583391	-	MVZ173937	<i>T. pallidior</i>	PE: Arequipa
H30 HM583387	-	NK96072	<i>T. pallidior</i>	CH: Taracapá,Iquique, Colchone
H31 HM583386	-	NK23533	<i>T. pallidior</i>	BO: Tarija, Serranía Sama

Tabela 7. (Cont.)

Hcyb(GB)	HvWF(GB)	Amostra	Taxon	Localidade
H32 HM583379	-	NK96763	<i>T. elegans</i>	BO: Valparaíso, Zapalla
H33 HM583369	-	OCGR1525	<i>T. pulchellus</i>	AR: Catamarca, Chumbicha
H34 HM583450	-	OMNH22284	<i>T. velutinus</i>	BR: Distrito Federal,
H35 HM583451	-	OMNH37216	<i>T. velutinus</i>	BR: Distrito Federal, Jardim botânico
HM583365	-	PNG1398	L.halli	Ar: Rio Negro
KF313984	-	LBCE7486	<i>C. agricolai</i>	BR: Goiás, Serranópolis
KF313981	-	JAO1184	<i>G. agilis</i>	BR: Bahia, Rio de Contas
KF313982	-	LBCE6655	<i>G. microtarsus</i>	BR: Rio de Janeiro, Teresópolis
KC954772	-	JLP16216	<i>M. pauliensis</i>	BR: São Paulo, Capão Bonito
KC954771	-	MAM186	<i>M. incanus</i>	BR: Rio de Janeiro, Mangaratiba

O gene *MT-CYB* (1149 pb) das amostras aqui sequenciadas e das amostras retiradas do *GenBank* mostrou 11 haplótipos de *T. macrurus* e sete de *T. karimii* (Tab. 7). As estimativas de distância genética intraespecíficas com *MT-CYB* variaram de 0,1 a 1,2 entre *T. macrurus*, em *T. pallidior* variou de 0,7 a 5,7, e de 0,5 a 2,3 entre *T. karimii*. Dentre as duas amostras de *T. velutinus* a distância genética foi de 0,5, em *T. sponsorius* foi 3,3, a distância entre *T. venustus* foi de 0,3, e entre *T. pusillus* foi 1,6 (Tab. 8). A distância interespecífica entre *T. macrurus* e *T. karimii* variou de 15,4 a 15,7, entre *T. pusillus* e *T. citellus* foi de 8,0, entre *T. pulchellus* e *T. pusillus* foi de 6,9, entre *T. pulchellus* e *T. citellus* foi de 5,2, a distância entre *T. elegans* e *T. tatei* foi de 10,7, e a distância entre *T. venustus* e *T. sponsorius* variou de 13,4 a 14,5, entre *T. pallidior* e *T. tatei* foi de 10,2 a 10,8, entre *T. pallidior* e *T. elegans* foi de 9,7 a 9,9, entre *T. macrurus* e *T. pusillus* foi de 13,9 a 14,9, entre *T. macrurus* e *T. venustus* foi de 14,6 a 15,7, entre *T. macrurus* e *T. sponsorius* foi 14,9 a 16,0, e entre *T. karimii* e *T. velutinus* foi de 15,2 e 16,2 (Tab. 8).

Tabela 8. Estimativas de distância genética com o marcador *MT-CYB* entre haplótipos de *Thylamys* com o modelo Kimura 2-parâmetros, discriminando haplótipo (H) e táxon.

N	Táxon	H	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	28	30	31	32	33		
1	<i>macrurus</i>	H1																																			
2	<i>macrurus</i>	H2	0,1																																		
3	<i>macrurus</i>	H3	0,3	0,4																																	
4	<i>macrurus</i>	H4	0,5	0,6	0,2																																
5	<i>macrurus</i>	H5	0,4	0,3	0,1	0,3																															
6	<i>macrurus</i>	H6	0,3	0,3	0,2	0,3	0,1																														
7	<i>macrurus</i>	H7	0,5	0,4	0,2	0,3	0,1	0,2																													
8	<i>macrurus</i>	H8	0,4	0,5	0,1	0,3	0,2	0,3	0,1																												
9	<i>macrurus</i>	H9	0,7	0,6	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4																											
10	<i>macrurus</i>	H18	1,2	1,1	1,1	1,2	1,0	1,1	1,1	1,1	1,2																										
11	<i>macrurus</i>	H19	1,2	1,1	0,9	1,1	0,8	0,9	0,9	1,0	1,1	0,7																									
12	<i>karimii</i>	H11	15,5	15,4	15,6	15,7	15,5	15,4	15,6	15,7	15,6	15,6																									
13	<i>karimii</i>	H12	15,2	15,1	15,3	15,4	15,2	15,1	15,3	15,4	15,3	15,3	0,5																								
14	<i>karimii</i>	H13	15,5	15,4	15,6	15,7	15,5	15,4	15,6	15,7	15,6	15,6	1,1	1,1																							
15	<i>karimii</i>	H14	15,7	15,6	15,8	15,9	15,7	15,6	15,9	16,0	15,9	15,8	15,9	0,8	1,0	1,1																					
16	<i>karimii</i>	H15	15,7	15,6	15,9	15,9	15,7	15,6	15,9	16,0	15,9	15,7	15,9	1,1	1,1	0,6	1,2																				
17	<i>karimii</i>	H16	15,4	15,3	15,5	15,6	15,4	15,3	15,5	15,6	15,5	15,4	15,4	2,0	2,0	2,2	1,5	2,3																			
18	<i>karimii</i>	H17	15,4	15,3	15,5	15,6	15,4	15,3	15,5	15,6	15,5	15,7	15,5	0,9	0,9	0,9	1,0	1,0	1,9																		
19	<i>velutinus</i>	H34	18,0	17,9	18,2	18,4	18,0	17,9	18,2	18,3	18,2	18,3	18,3	15,4	15,6	15,8	15,8	16,2	15,3	15,7																	
20	<i>velutinus</i>	H35	18,2	18,1	18,4	18,6	18,2	18,1	18,4	18,5	18,4	18,5	18,5	15,2	15,5	15,7	15,8	16,0	15,2	15,6	0,5																
21	<i>pusillus</i>	H20	14,5	14,4	14,7	14,9	14,6	14,5	14,7	14,8	14,7	14,3	14,3	16,4	16,4	15,9	16,7	16,7	16,2	16,5	17,4	17,6															
22	<i>pusillus</i>	H21	14,2	14,1	14,4	14,6	14,3	14,2	14,4	14,5	14,4	13,9	13,9	16,3	16,3	16,0	16,6	16,6	16,3	16,5	16,9	16,9	1,6														
23	<i>citellus</i>	H22	15,3	15,2	15,3	15,6	15,2	15,1	15,1	15,2	15,0	15,6	15,6	16,4	16,4	16,4	16,5	16,8	15,9	16,1	17,7	17,9	8,1	8,0													
24	<i>pulchellus</i>	H33	16,2	16,1	16,4	16,7	16,3	16,2	16,2	16,3	16,2	16,7	16,9	15,7	15,7	15,9	16,0	16,2	16,1	15,8	18,2	18,1	7,4	6,9	5,2												
25	<i>venustus</i>	H23	14,7	14,6	15,0	15,2	14,9	14,8	14,8	14,9	14,6	15,3	15,3	17,6	17,8	18,3	18,1	18,7	18,2	18,2	15,1	15,5	15,6	14,9	15,6	15,7											
26	<i>venustus</i>	H24	15,1	15,0	15,3	15,5	15,2	15,1	15,1	15,2	15,0	15,6	15,7	18,0	18,2	18,7	18,4	19,0	18,5	18,6	14,9	15,4	15,7	14,8	15,7	16,1	0,3										
27	<i>sponsorius</i>	H26	15,0	14,9	15,4	15,6	15,3	15,2	15,4	15,5	15,4	15,6	15,5	17,5	17,9	17,7	18,2	18,0	18,0	17,8	18,2	18,1	17,4	16,7	17,1	18,2	13,5	13,4									
28	<i>sponsorius</i>	H27	15,6	15,5	15,7	16,0	15,6	15,5	15,8	15,9	15,8	16,0	15,8	18,8	19,3	19,3	19,5	19,6	19,2	19,2	18,7	18,6	17,5	16,9	17,8	18,8	14,5	14,3	3,3								
29	<i>pallidior</i>	H28	15,1	15,0	15,3	15,5	15,2	15,1	15,3	15,4	15,5	15,3	15,7	16,3	15,8	15,8	16,5	16,2	16,6	16,1	16,2	16,0	13,2	12,1	14,4	13,1	15,4	15,3	18,4	18,9							
30	<i>pallidior</i>	H29	15,3	15,2	15,3	15,5	15,2	15,1	15,3	15,4	15,3	15,3	15,5	15,7	15,2	15,4	15,9	16,0	15,8	15,3	15,1	15,3	13,1	12,6	13,7	12,7	14,1	14,0	17,8	17,6	5,3						
31	<i>pallidior</i>	H30	15,8	15,7	16,0	16,1	15,9	15,8	16,0	16,1	16,2	15,7	16,0	16,5	16,0	16,5	16,7	16,8	16,6	16,1	16,3	16,2	13,2	12,9	14,2	13,2	15,9	15,8	18,9	18,6	5,4	4,0					
32	<i>pallidior</i>	H31	16,1	16,0	16,4	16,5	16,3	16,1	16,4	16,5	16,6	16,1	16,4	16,7	16,2	16,7	16,9	17,1	16,8	16,4	16,5	16,3	13,1	13,0	14,1	13,4	16,4	16,3	19,1	18,9	5,7	4,4	0,7				
33	<i>elegans</i>	H32	15,0	14,9	15,5	15,6	15,4	15,3	15,5	15,6	15,5	15,2	15,7	16,8	16,4	16,4	17,2	16,8	17,1	16,5	17,3	17,5	13,8	14,1	14,7	14,3	15,2	15,6	17,1	17,0	9,9	9,7	9,9	9,8			
34	<i>tatei</i>	H35	15,1	15,0	15,6	15,7	15,5	15,4	15,6	15,7	15,6	15,3	15,8	15,5	15,0	15,3	15,4	15,6	15,2	14,9	17,2	16,8	14,0	13,7	14,6	13,3	16,0	16,2	18,0	18,5	10,8	10,2	10,2	10,8	10,7		

As análises de máxima verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) para o *MT-CYB* confirmaram o monofiletismo de *Thylamys* e de todas as espécies com mais de uma amostra, com alto suporte (97,9 de bootstrap, 0,98 aLRT, 1 de pp). Nessa análise o gênero se divide em dois clados, um com *T. karimii* e *T. velutinus* (100 bootstrap, 1 aLRT e 1pp), e o outro com restante das amostras (97,4 bootstrap, 0,98 aLRT, 1pp) dividido em dois grupos: (1) formado por *T. macrurus* agrupado com *T. venustus* e *T. sponsorius*, sem suporte, entretanto o clado composto por *T. venustus* e *T. sponsorius* apresentou altos valores de suporte (94, 1 bootstrap, 0,93 aLRT e 1 pp), e (2) o outro clado com o restante das espécies, também dividido em dois: (1) com *T. pusillus*, *T. citellus* e *T. pulchellus* formando um grupo, com alto suporte (100 bootstrap, 1 aLRT, 1 pp), e (2) *T. tatei*, *T. elegans* e *T. pallidior* (95, 9 bootstrap, 0,95 aLRT, e 0,99 pp) (Fig. 13 e 14).

5.3.2 e28-VWF

O sequenciamento do *e28-VWF* (cerca de 977 pb) de 21 amostras de *Thylamys*, 12 de *T. macrurus* e nove de *T. karimii* mostrou dois haplótipos para *T. macrurus* (H1 e H2), e um para *T. karimii* (H3; Tab. 7). As estimativas de distância genética intraespecíficas com *e28-VWF* variaram de 0,1 entre *T. pallidior* e *T. macrurus* a 1,2 entre *T. macrurus* e *T. karimii* (Tab. 9). Algumas estimativas intraespecíficas de *T. macrurus* foram equivalentes (0,1) quanto a distância interespecífica entre *T. macrurus* e *T. pallidior* (Tab. 9).

As análises de máxima verossimilhança (MV) e Inferência Bayesiana (IB) para o *e28-VWF* reiteraram o monofiletismo de *Thylamys*, com alto suporte, com *T. karimii* como linhagem basal (96,1 bootstrap, 0,91 aLRT, e 0,99 de pp), seguida por *T. pallidior* (96,1 bootstrap, 0,91 aLRT, e 0,99 pp) que fica intermediária entre *T. karimii* e uma outra linhagem que agrupa *T. macrurus* com *T. venustus* e *T. pusillus*, (72,2 bootstrap, 0,84 aLRT, e 0,96 pp).

Tabela 9. Distância genética com o marcador *e28-VWF* entre as amostras de *Thylamys* com modelo Kimura 2-parâmetros, discriminando o haplótipo (H) e o táxon.

	Táxon	1	2	3	4	5
H H3	<i>T. karimii</i>					
H1	<i>T. macrurus</i>	1,3				
H2	<i>T. macrurus</i>	1,2	0,1			
H4	<i>T. pusillus</i>	1,0	0,5	0,3		
H5	<i>T. venustus</i>	1,0	0,7	0,6	0,7	
H6	<i>T. pallidior</i>	1,0	0,2	0,1	0,2	0,5

5.4 Datação

A análise de divergência aqui realizada mostra que (1) *Thylamys* divergiu de *Lestodelphys* há aproximadamente 12,5 Ma no Mioceno, (2) *T. karimii* e *T. velutinus* divergiram há cerca de 7,6 Ma no Mioceno, (3) *T. macrurus* parece ter divergido de *T. venustus* e *T. sponsorius* há cerca de 7,7 Ma no Mioceno, e (4) *T. macrurus* divergiu do restante das espécies há cerca 6,8 Ma no Mioceno. As espécies *T. sponsorius* e *T. venustus* divergiram por volta de 5 Ma no Plioceno. O clado que agrupa *T. pusillus*, *T. citellus* e *T. pulchellus* tem uma divergência estimada entre 5,7 Ma (Mioceno) do clado que agrupa *T. tatei*, *T. elegans* e *T. pallidior*. O tempo de divergência entre *T. tatei* de *T. elegans* foi de cerca de 4 Ma, no Plioceno, entre *T. elegans* e *T. pallidior*, o tempo de divergência foi de cerca de 3,3 Ma no Plioceno. A linhagem que deu origem a *T. citellus* e *T. pulchellus* parece ter divergido de *T. pusillus* cerca de 2,3 Ma no Plioceno.

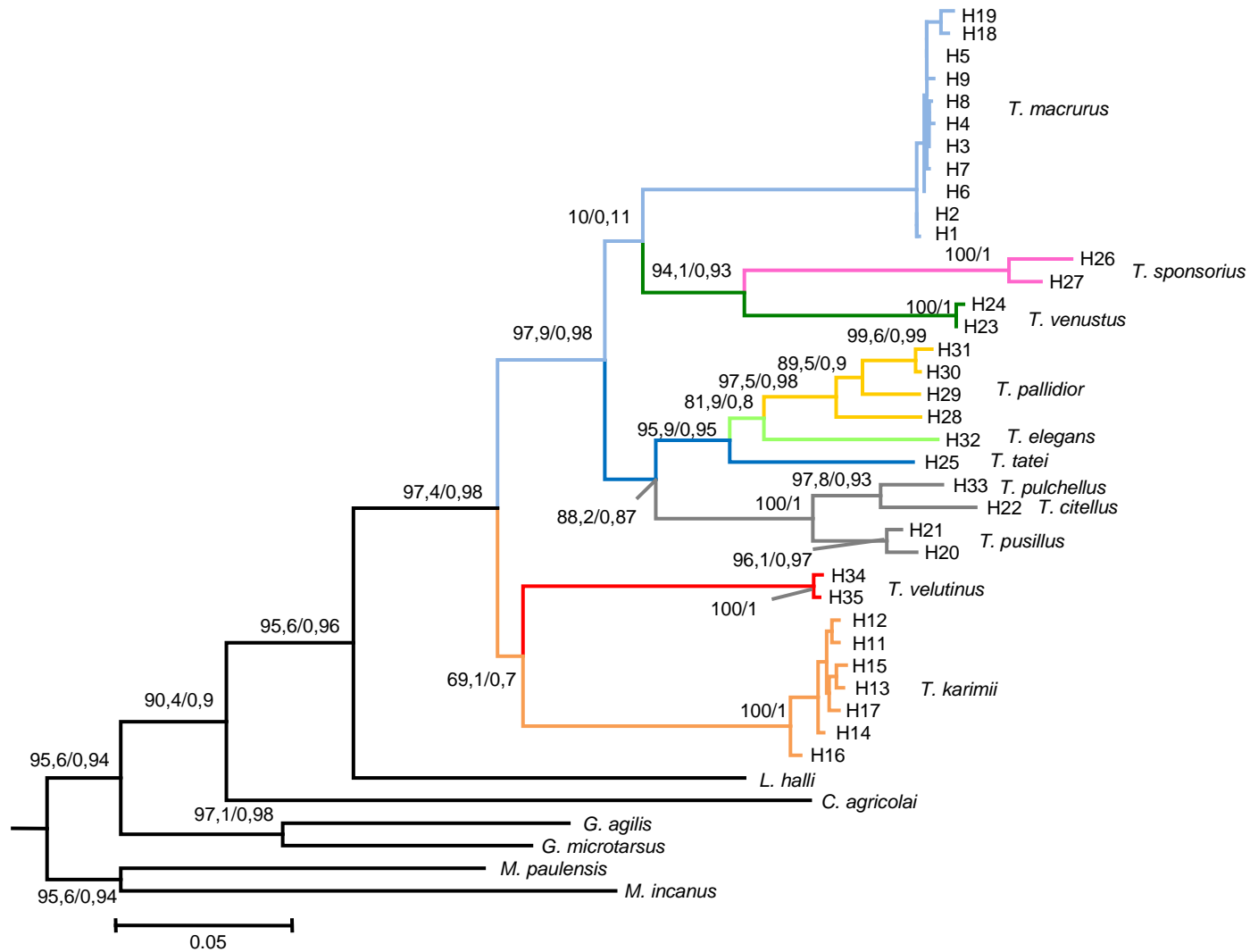


Figura 13. Topologia de ML com *MT-CYB* para o gênero *Thylamys*. Valores próximo aos nós representam suporte de Bootstrap e aLRT.

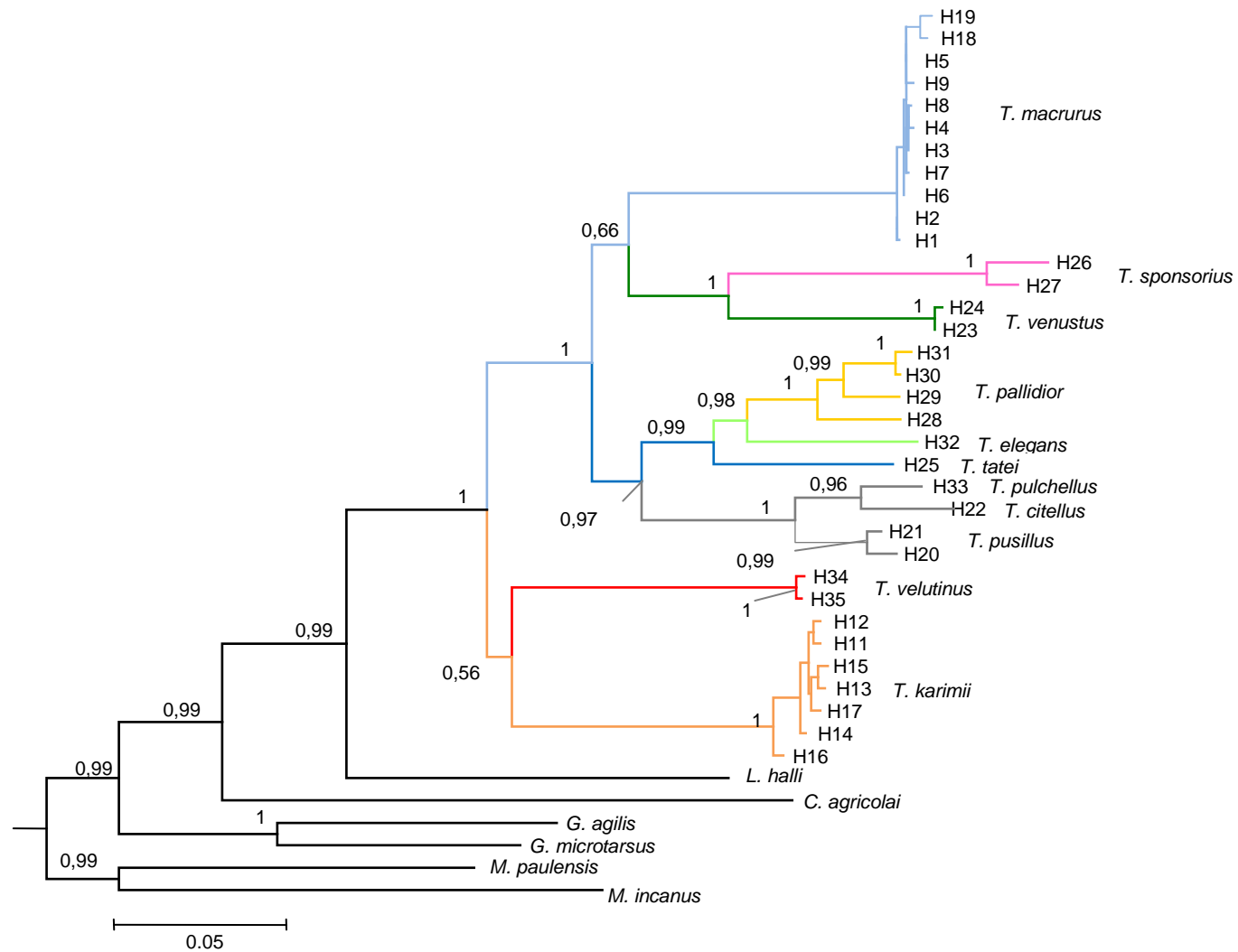


Figura 14. Topologia de IB com *MT-CYB* para o gênero *Thylamys*. Valores próximos aos nós representam suporte de probabilidade posterior.

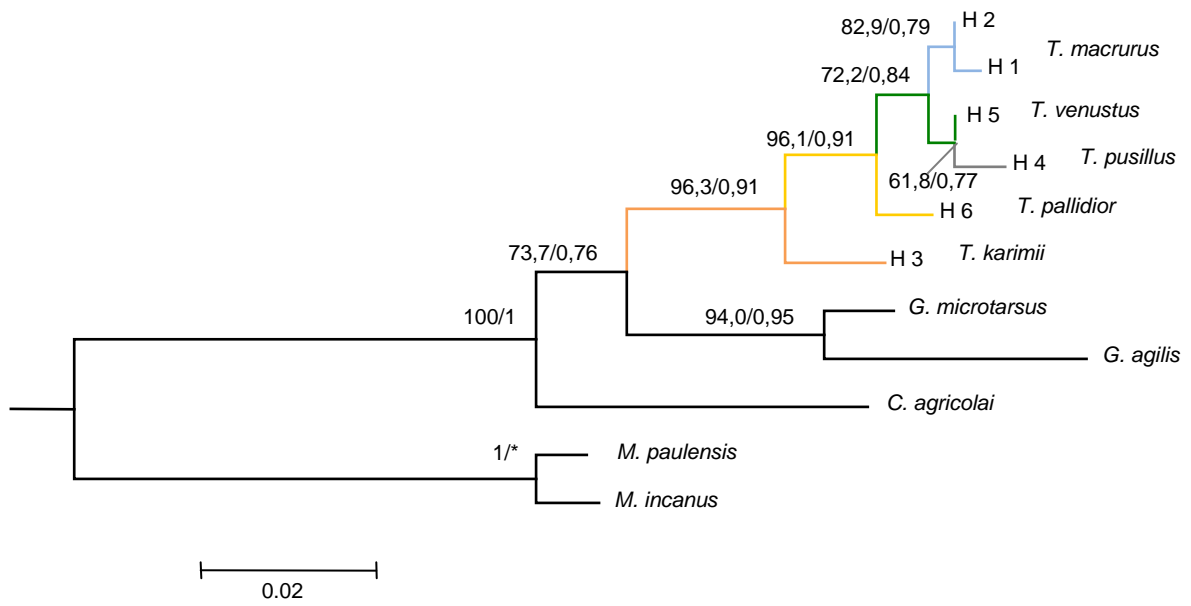


Figura 15. Topologia de ML com o *e28-vWF* para o gênero *Thylamys*. Valores próximos aos nós representam suporte de Bootstrap e aLRT. * Não possui suporte para aLRT.

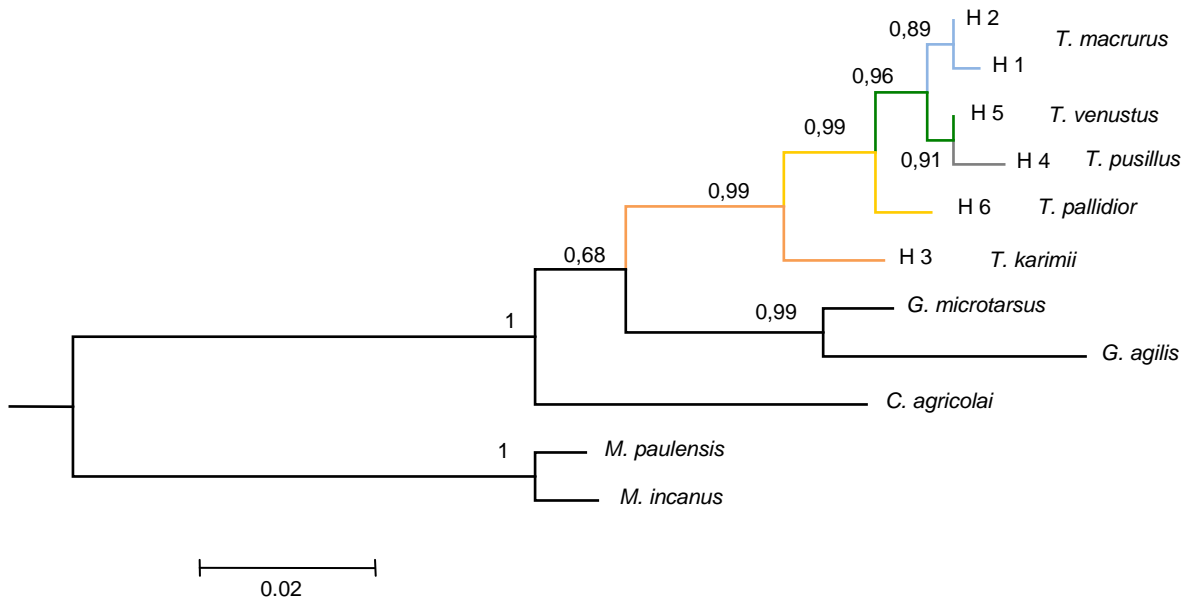


Figura 16. Topologia de IB com o *e28-vWF* para o gênero *Thylamys*. Valores próximos aos nós representam suporte de probabilidade posterior.

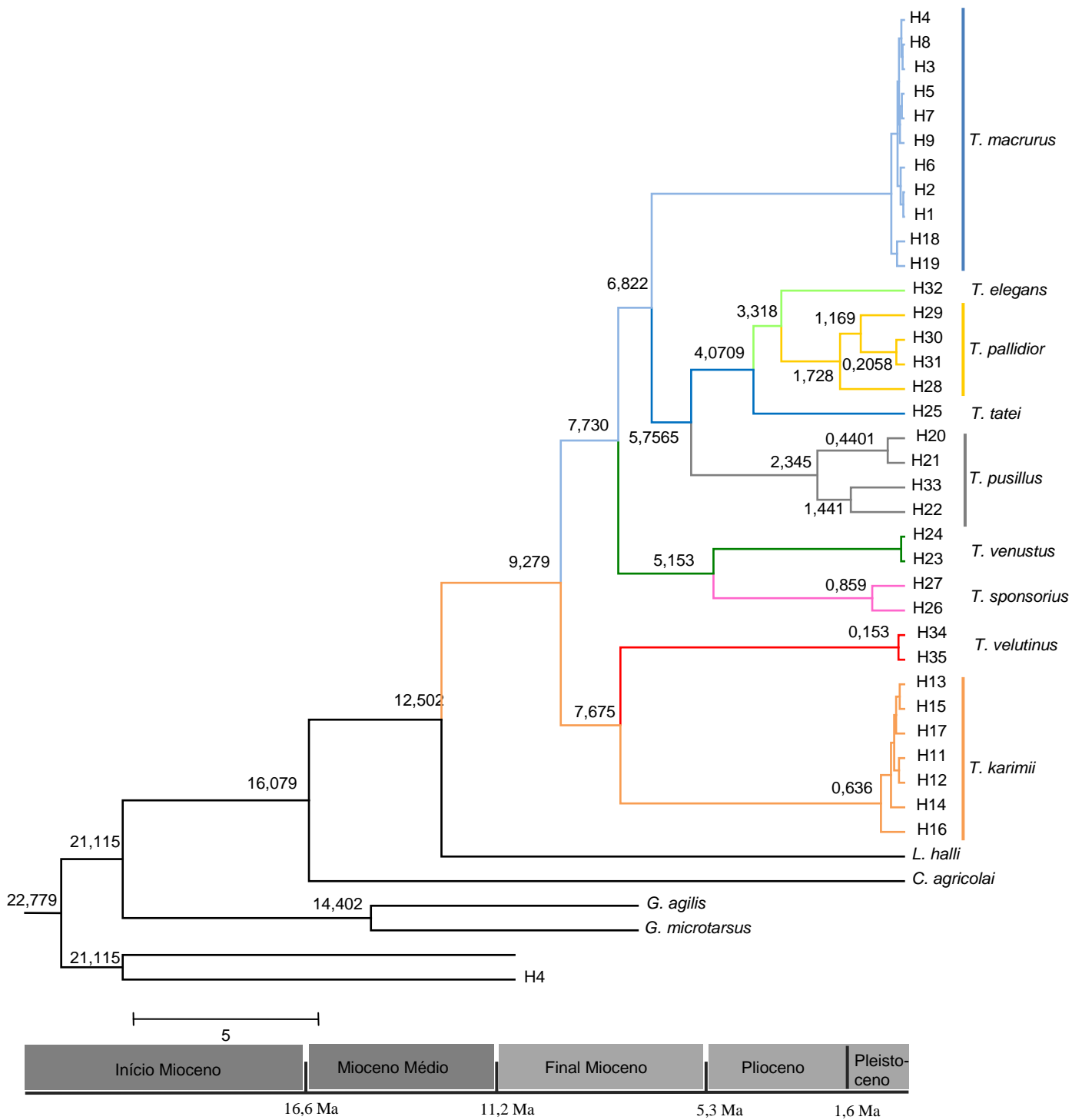


Figura 17. Árvore de tempo de divergência com o *MT-CYB* da tribo Thylamyini, enfatizando as espécies de *Thylamys*. Valores próximos aos nós representam valores de divergência estimados.

6. Discussão

6.1 Caracteres morfológicos

Foram analisados 15 espécime de *T. macrurus*, um adulto e dois jovens de *T. karimii* e um adulto de *T. pusillus*. Em relação às características morfológicas, os espécimes de *T. karimii* e *T. macrurus* aqui analisados são diferentes, e foram facilmente identificadas a partir dos seguintes caracteres: (1) forame palatal posterolateral de *T. karimii* é grande, atingindo o protocone do quarto molar, enquanto em *T. macrurus* é pequeno e não chega a atingir o protocone do quarto molar; (2) bula timpânica menos robusta em *T. macrurus*, sendo maior em *T. karimii*, (3) garra de *T. karimii* é longa, ultrapassando o limite das pontas dos dedos, enquanto em *T. macrurus* é curta, não ultrapassando o limite das pontas dos dedos; (4) a fenestra palatina é maior em *T. macrurus* que em *T. karimii*, que é menor e mais discreta; 5) a cauda menor que o comprimento da cabeça e corpo em *T. karimii*, e maior que o comprimento da cabeça e do corpo *T. macrurus*. Esses caracteres já haviam sido levantados em trabalhos anteriores (Carmignotto & Monfort, 2006; Voss *et al.*, 2009). Em vista ventral, o canal da carótida em *T. karimii* é mais aberto, maior e mais visível, enquanto em *T. macrurus* é menor e menos visível, pois a abertura é no sentido do osso basioccipital.

Algumas características morfológicas também diferem os espécimes de *T. pusillus* de *T. macrurus* e de *T. karimii* aqui analisados, as primeiras podem ocorrer em simpatria (Cáceres, 2007) e anteriormente foram consideradas a mesma espécie. O forame palatal posterolateral de *T. karimii* é grande, atingindo o protocone do quarto molar, em *T. pusillus* tem tamanho intermediário, mas ainda atinge o protocone do quarto molar, enquanto em *T. macrurus* é pequeno, e não atinge o protocone do quarto molar. A fenestra palatina de *T. pusillus* é maior como a de *T. macrurus*. A base da orelha de *T. pusillus* e *T. karimii* é bem alaranjada, e em *T. macrurus* é mais pálido. As garras de *T. pusillus* e *T. macrurus* atingem o limite das pontas dos dedos e as patas dianteiras e traseiras possuem dermatóglifos, em *T. karimii* as garras ultrapassam o limite das pontas dos dedos, e não possuem dermatóglifos. Em *T. pusillus* e *T. macrurus* a cauda é maior que o comprimento cabeça-corpo, enquanto em *T. karimii*, a cauda é menor que o comprimento cabeça-corpo.

Diferente da maior parte dos pequenos marsupiais da América do Sul, o gênero apresenta distribuição predominante em formações abertas e savânicas, sendo encontrado principalmente no Cerrado e Caatinga no Brasil (Carmignotto & Monfort, 2006; Palma & Vieira, 2012). Em relação ao uso do habitat, *T. karimii* ocorre no cerrado *sensu stricto* e no cerrado ralo, uma variação do cerrado típico, onde as árvores são mais esparsas. *Thylamys macrurus* ocorre em floresta semi-decídua (Cáceres *et al.*, 2007; Andreazzi *et al.*, 2011).

6.2 Variação cariotípica em *Thylamys*

Todas as espécies de marsupiais sul americanos são caracterizadas por possuir número diplóide baixo, 14, 18 ou 22 (Reig *et al.*, 1977). Pelo menos sete gêneros de marsupiais sul americanos compartilham o número diploide de 14, *Caluromys*, *Cryptonanus*, *Dromiciops*, *Gracilinanus*, *Marmosa* (incluindo *Micoureus*), *Marmosops* e *Thylamys* (Reig *et al.*, 1977; Carvalho *et al.*, 2002). Todas as espécies de *Thylamys* compartilham esse número diploide. O cariótipo de um espécime de *Thylamys karimii* da Bahia mostrou $2n = 14$ e $NF = 20$ (Figura 9), semelhante ao descrito, mas não ilustrado, para espécimes do Piauí (Carmignotto & Monfort, 2006). Este é o primeiro trabalho a ilustrar o cariótipo de *T. karimii*. Um cariótipo similar foi encontrado para três espécimes de *T. venustus* de Quillacollo na Bolívia (LBCE 5751, LBCE 5736, LBCE 5743). Esses mesmos números diplóides e fundamental foram descritos para espécimes de *Thylamys venustus* de diferentes localidades da Bolívia (Palma & Yates, 1996). Esse $2n$ e NF é compartilhado por várias espécies do gênero, *T. cinderella* (Braun *et al.*, 2005), *T. elegans* (Palma & Yates, 1996; Spotorno *et al.*, 1997), *T. karimii* (Carmignotto *et al.*, 2006), *T. macrurus* (Palma, 1995), *T. pallidior* (Palma 1995, Palma e Yates, 1996), *T. pusillus* (Palma e Yates, 1996), e *T. sponsorius* (Braun *et al.*, 2005). Entretanto, três números fundamentais autossômicos foram atribuídos a *T. elegans* $NF = 20$ (Spotorno *et al.*, 1997; Palma & Yates, 1996; Shchipanov *et al.*, 1996), $NF = 22$ (Reig, 1977), e $NF = 24$ (Reig *et al.*, 1972, Fernandez-Donso *et al.*, 1979). Também dois NF foram atribuídos a *T. pusillus*, $NF = 20$ (Reig, 1997) e $NF = 24$ (Palma & Yates, 1996). Uma possível explicação para essas discordâncias em relação ao NF de *Thylamys* seria a interpretação da morfologia dos cromossomos

subtelocêntricos, interpretados como cromossomos de um braço ou de dois braços, possivelmente devido a diferenças no grau de condensamento dos cromossomos. Diferentes preparações cromossômicas mostram cromossomos com diferentes graus de alongamento, e esse parâmetro influencia na interpretação da morfologia. Assim, em metáfases com os cromossomos muito condensados, os subtelocêntricos parecem com acrocêntricos (Reig *et al.*, 1977), e em metáfases menos condensadas sua morfologia parece com a de cromossomos de dois braços.

Outra espécie, *T. velutinus*, foi caracterizada com $2n=14$ e $NF=24$ (Carvalho *et al.* 2002), mas o cariótipo apresentado pelos autores claramente possui dois pares de cromossomos subtelocêntricos, que foram por eles interpretados como cromossomos de dois braços, e é por nós interpretado como cromossomos de um braço. Este cenário sugere que todas as espécies de *Thylamys* têm cariótipo similar em relação ao $2n$ e NF . Machos da espécie *T. pallidior* foram caracterizados como possuindo $2n=13$ por Palma *et al.* (1995) e Braun *et al.* (2010), e os autores sugerem a possibilidade de translocação do cromossomo Y. Palma *et al.* (1995) sugerem também a ocorrência de mosaicismos cromossômico entre as células germinativas e somáticas.

Em relação ao cromossomo sexual X a variação na morfologia é clara. O cromossomo X parece não variar em algumas espécies, sendo metacêntrico em *T. karimii* (este estudo), submetacêntrico em *T. pusillus* (Palma & Yates, 1996; Reig, 1997) e em *T. velutinus* (Carvalho *et al.* 2002), e acrocêntrico em *T. macrurus* (Palma, 1995) e *T. pallidior* (Palma & Yates, 1996, Palma, 1995; Braun *et al.*, 2010). Várias morfologias tem sido associadas ao cromossomo X de *T. elegans*, submetacêntrico (Reig *et al.*, 1972, Reig, 1997), acrocêntrico (Palma & Yates, 1996, Fernandez-Donso *et al.*, 1979), e subtelocêntrico (Spotorno *et al.*, 1997). *T. venustus* também parece ter o cromossomo X variável, sendo acrocêntrico (Palma e Yates, 1996) ou submetacêntrico (este estudo).

Em relação ao cromossomo sexual Y é acrocêntrico em *T. venustus* aqui estudado. Diferentes morfologias têm sido atribuídas ao cromossomo Y de *T. elegans* e *T. velutinus* que pode ser pontual (Reig *et al.*, 1972; Reig, 1977; Page *et al.*, 2003) ou acrocêntrico (Reig 1977; Carvalho *et al.* 2002).

Pode-se então concluir que todas as espécies de *Thylamys* possuem $2n = 14$ e $NF = 20$, com variações na morfologia dos cromossomos sexuais.

6.3 Relações filogenéticas

As análises filogenéticas mostraram o gênero *Thylamys* e as espécies aqui analisadas com mais de uma amostra como monofiléticos, corroborando estudos anteriores (Braun *et al.*, 2005; Giarla *et al.*, 2010; Giarla & Jansa, 2013; Palma *et al.*, 2014; Teta *et al.*, 2009; Voss & Jansa, 2009).

Nas análises de ML e IB de *MT-CYB* e *e28vWF*, *T. karimii* e *T. velutinus* ficam agrupadas como espécies irmãs, com baixo suporte, tendo como grupo irmão todas as outras espécies de *Thylamys*. Esse arranjo já foi encontrado em estudos anteriores baseados em dados moleculares (Giarla & Jansa, 2013), e um estudo anterior, baseado em morfologia, descreve um novo subgênero, *Xerodelphys*, para alocar as espécies deste clado, *T. karimii* e *T. velutinus* (Giarla *et al.*, 2010). Outros estudos mostram *T. karimii* como espécie mais basal, tendo como grupo irmão todas as outras espécies de *Thylamys* (Palma *et al.*, 2014, e Teta *et al.*, 2009), enquanto em Giarla *et al.* (2010) encontra *T. velutinus* como a linhagem mais basal, com *T. karimii* ocupando uma posição intermediária em relação as outras espécies, mas com baixo suporte. Carvalho *et al.* (2009) publicaram um trabalho em que *T. macrurus* ficou posicionada como a linhagem mais basal, porém não foram utilizadas amostras de *T. velutinus* em suas análises, e *T. karimii* ficou agrupada à um clado com *T. pusillus*. No trabalho de Braun *et al.* (2005) *T. macrurus* também ficou como a espécie basal do gênero, porém não foram utilizadas amostras de outras espécies brasileiras (*T. karimii* e *T. velutinus*) nas análises.

Nas topologias aqui inferidas com o *MT-CYB* as amostras de *T. macrurus* aparecem como grupo irmão do clado (*T. venustus* e *T. sponsorius*), mas com baixo suporte, corroborando o resultado de Giarla & Jansa (2013). apesar dessa relação não ter ficado clara, devido à falta de suporte. O clado *T. pusillus*, *T. citellus* e *T. pulchelus*, agrupado ao clado de *T. tatei*, *T. elegans* e *T. pallidior* com alto valores de suporte, corrobora trabalho anteriores (Giarla *et al.*, 2010; Palma *et al.*, 2014). Giarla & Jansa (2013) encontram haplogrupos de

T. pusillus (*T. pusillus* A, B e C) que devem corresponder as espécies *T. citellus* e *T. pulchellus* reconhecidas por Teta *et al.* (2009)

O clado *T. venustus* e *T. sponsorius* teve alto suporte, corroborando trabalho anteriores (Palma *et al.*, 2014; Giarla *et al.*, 2014; Giarla & Jansa, 2013; Giarla *et al.*, 2010). A posição das espécies *T. pallidior* e *T. elegans* como táxons irmãos, na topologia aqui inferida ficou bem suportada, corroborou os trabalhos anteriores (Teta *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2014; Giarla & Jansa, 2013), assim como a *T. elegans* como táxon mais próximo da espécie *T. tatei* (Giarla *et al.*, 2010; Teta *et al.*, 2009; Palma *et al.*, 2014).

As topologias inferidas com o *e28-vWF* foram menos informativas que as com o *MT-CYB*, devido ao menor número de amostras com esse marcador nuclear. Nessa análise *T. karimii* fica como a linhagem mais basal, *T. pallidior* fica em uma posição intermediária, com o restante das espécies agrupadas em um clado, onde na ML e na IB *T. macrurus* aparece como grupo irmão de *T. venustus* e *T. pusillus* e estas últimas estão agrupadas. Este último arranjo corrobora estudos anteriores (Voss *et al.*, 2009)

6.4 Considerações biogeográficas

Há autores que sugerem que a origem dos marsupiais ocorreu na América do Norte, outros sugerem na América do Sul, na Austrália e alguns outros autores na Antártica (Marshall, 1987; Pascual, 1996). Os imigrantes ancestrais que deram origem a fauna de marsupiais Sul-Americanos (Simpson, 1950) provavelmente vieram da Eurásia quando os continentes ainda estavam conectados. No Início do Cenozóico, no Paleoceno, a América do Sul ainda estava conectada com a Antártica e essa se conectava com a Austrália, o que possibilitava a migração de organismos da fauna e flora entre ambos os continentes (Pascual & Ortiz-Jauuizar, 2007). O gênero *Thylamys* possui fósseis datados do final do Mioceno e início do Plioceno, no Cenozóico com os fósseis *T. pinei*, *T. contrerasi* e *T. zetti* (Goin *et al.*, 2000; Goin, 1997; Mones, 1980).

O padrão de diversidade molecular encontrado com *MT-CYB* neste trabalho sugere que *Thylamys* possui uma grande diversidade genética. As radiações ocorreram a partir de duas subpopulações possivelmente localizadas ao leste do Brasil (leste do Cerrado-Oeste da Caatinga) com as espécies *T.*

karimii e *T. velutinus* que formam o subgênero *Xerodelphys* e outro no extremo oeste (leste do Chaco-Oeste do Cerrado) que inclui o restante das espécies incluídas ao subgênero *Thylamys*, grupo Elegans e Grupo venustus. A radiação da linhagem que deu origem a *T. karimii* e *T. velutinus* pode ter iniciado a dispersão em direção ao Brasil, no Mioceno Médio, quando mares epicontinentais se formaram sob o continente Sul-Americano. A formação desses mares, principalmente do “Mar Paranaense”, pode ter sido o principal motivo da dispersão dessa linhagem que, possivelmente, em busca de abrigo, proteção e alimento seguiu em direção as regiões brasileiras através de fragmentos de Savana que conectavam até o Cerrado. No Mioceno Médio, além da formação desses mares epicontinentais que se formaram à partir de introgressões marinhas, também houve uma intensificação do soerguimento dos Andes e da formação do Planalto Central. Esses eventos ocorridos intensificaram a formação da Diagonal de áreas secas que vai desde a Patagônia Argentina até o Nordeste do Brasil e é caracterizada por se localizar em áreas de vegetação aberta e seca, com menor pluviosidade (Zanella, 2012). Portanto, o leste do Cerrado-Oeste da Caatinga podem ter sido locais de dispersão e refúgio da linhagem que deu origem a *T. karimii* e *T. velutinus*.

As análises filogenéticas com o marcador mitocondrial mostrou *T. karimii* e *T. velutinus* agrupadas como espécies irmãs, basais, corroborando Giarla & Jansa (2013), e o marcador nuclear foi concordante com o marcador mitocondrial, em colocar *T. karimii* à parte das outras espécies (nessa análise não foi incluído *T. velutinus*), espécie com ampla distribuição geográfica no Cerrado e com localidades marginais na Caatinga do Brasil (Figuras 1). Nossos resultados suportam a divisão de *Thylamys* em duas linhagens, corroborando estudos anteriores (Giarla *et al.* 2010) com caracteres morfológicos, que descrevem dentro de *Thylamys* o subgênero *Xerodelphys* e sugerem a área do Cerrado e da Caatinga como a área onde ocorreu a radiação deste subgênero, com as espécies *T. karimii* e *T. velutinus*. O maior número amostral aqui utilizado corroboram o Cerrado e Caatinga do Brasil como locais onde as espécies alocadas ao subgênero *Xerodelphys* se diferenciaram das outras espécies de *Thylamys*. No cenário atual, *T. velutinus* ocorre ao sul da distribuição de *T. karimii*, com simpatria no sul da distribuição de *T. karimii*. E *T.*

karimii possui uma distribuição mais ampla, ocorrendo principalmente no Cerrado, mas também em áreas adjacentes da Caatinga.

Nossas análises sugerem outra radiação quase concomitante na região entre o Chaco e Cerrado originando as outras espécies de *Thylamys*, com *Thylamys macrurus* e o restante das espécies. Possivelmente, a maioria das espécies se diferenciaram no Plioceno. Baseado no compartilhamento de similaridades entre *T. pusillus* (situada no Chaco subtropical e regiões temperadas no Sul da América do Sul) e *T. macrurus* (ocupando florestas subtropicais mais ao leste do Rio Paraguai), foi postulado que *Thylamys pusillus* se divergiu a partir de um ancestral em comum com *T. macrurus* (Solari 2003). Nossos dados baseados nos marcadores mitocondriais e nucleares não são conclusivos sobre as relações filogenéticas entre *T. macrurus* e *T. pusillus*. No entanto, o marcador mitocondrial mostra *T. macrurus* como uma radiação distinta daquela que originou *T. pusillus*, *T. pulchellus*, *T. citellus* e *T. pallidior*, *T. elegans* e *T. tatei*, corroborando estudos anteriores (Giarla & Jansa, 2013).

Aparentemente *T. citellus* está geograficamente separado de *T. pulchellus* pelo rio Paraná, e *T. puchellus* está separado de *T. pusillus* pelo rio Bermejo (Teta *et al.*, 2009). Apesar de *T. pusillus* e *T. macrurus* não serem grupos irmãos, existem indícios que *T. pusillus* não ocorre na margem leste do rio Paraguai, onde *T. macrurus* ocorre (Palma *et al.*, 2014; Giarla & Jansa, 2013; Voss *et al.*, 2009). Rio como barreira também foi utilizado para separar algumas subespécies de *T. elegans* (Palma *et al.*, 2014).

Neste trabalho só foram analisadas amostras de *T. karimii* da margem esquerda do rio São Francisco, futuros estudos são necessários para verificar se o rio está atuando como barreira ao fluxo gênico atual da população dessa espécie. Este rio corre através do Cerrado, Caatinga e parte da Mata Atlântica, e é um dos maiores da América do Sul, e a terceira maior bacia no Brasil, cobrindo uma área aproximada de 645,000 Km² (Godinho & Godinho, 2003).

6.5 Análise de tempo de divergência

Os tempos de divergência entre as linhagens de *Thylamys* aqui estimados diferem daqueles de trabalhos anteriores (e.g., Giarla & Jansa, 2013; Palma *et al.*, 2014). O tempo de divergência estimado entre *Thylamys* e *Lestodelphys* encontrados por Giarla & Jansa (2013) foi de 3,4 Ma (com

intervalo dos valores de divergência de 2.7– 4.1 Ma), enquanto aqui foi encontrado 12,5 Ma; a separação entre *T. karimii* e *T. velutinus* do restante das espécies foi de aproximadamente 2,7 Ma, enquanto aqui encontramos 7,6 Ma. Essa diferença provavelmente é devido aos diferentes *priors* utilizados, Giarla & Jansa (2013) utilizaram dois *priors* com três fósseis para calibração externa (1) dois fósseis entre Didelphidae, incluindo a idade mínima entre *Didelphis* e *Philander* (3.3 ma), e a idade mínima para o clado entre *Monodelphis*, *Marmosa* e *Tlacuatzin* (12,1 Ma); e (2) um entre Australidelphia, idade mínima entre Dasyuromorphia and Peramelemorphia (24.7 Ma).

As estimativas de tempo de divergência também diferiram em relação ao trabalho de Palma *et al.* (2014) que encontraram (1) valor médio de 95% de HPD de 24,19 Ma entre a separação de *Thylamys* e o grupo de fora (*Lestodelphys* e *Marmosops*), enquanto o valor aqui encontrado foi de 22,7 Ma; (2) 18,58 Ma entre as espécies *T. karimii* e *T. velutinus*, e o valor aqui encontrado foi 7,6 Ma; (3) 12,43 Ma entre a divergência de *T. macrurus* e *T. sponsorius* e *T. venustus*, e o tempo de divergência aqui encontrado foi 7,7 Ma. Apesar de ter utilizado os mesmos *priors*, utilizaram apenas dois grupos de fora (*Lestodelphys* e *Marmosops*), enquanto aqui foram utilizados quatro táxons como grupo de fora (*Cryptonanus*, *Gracilinanus*, *Lestodelphys* e *Marmosops*).

Os tempos de divergência aqui estimados são mais similares ao de Vilela *et al.* (2015) que encontraram: (1) o valor de tempo de divergência estimado, do clado que separou *Marmosops* do restante da tribo Thylamyini foi de aproximadamente 28,2 Ma, o resultado aqui encontrado foi de 22,7 Ma; (2) cerca de 14 Ma para o clado que separa *Lestodelphys* de *Thylamys*, o tempo aqui encontrado foi de 12,5 Ma; e (3) cerca de 10 Ma para o clado de diversificação entre as espécies de *Thylamys*, o tempo de divergência aqui encontrado foi de aproximadamente 9,2 Ma.

Neste trabalho, foi realizada a primeira estimativa de tempo de divergência da tribo Thylamyini, incluindo pelo menos uma espécie de todos os gêneros da tribo, exceto *Chacodelphys*. O trabalho de Vilela *et al.* (2015) também utiliza todos os representantes disponíveis para a tribo, porém enfatizando os táxons de *Monodelphis*, enquanto no trabalho de Palma *et al.* (2014) foram utilizados apenas dois representantes da tribo como grupo externo, *Marmosops* e *Lestodelphys*.

Nossa análise mostra que o tempo de divergência da linhagem que deu origem às linhagens "*macrurus*" e "[*(citellus, pusillus, puchellus)*]+[*(tatei(elegans, pallidior)*]" é semelhante ao tempo estimado para a divergência da linhagem que levou ao clado (*karimii, velutinus*). Esse cenário aponta para radiações concomitantes. Esse resultado corrobora com a separação do gênero *Thylamys* em dois subgêneros (*Xerodelphys* e *Thylamys*), sugerindo duas radiações quase concomitantes: (1) a radiação leste-Cerrado-Oeste Caatinga e (2) leste Chaco-Oeste Cerrado. Este quadro também sugere que a inclusão de mais táxons é necessária para que se possa ter uma estimativa de relação filogenética e de tempo de divergência mais acurada.

7 Conclusões

- Características de *Thylamys* como tamanho da bula, forame palatal postero-lateral, fenestra palatina, canal da carótida e tamanho da cauda são eficientes para identificar as espécies *T. karimii*, *T. macrurus* e *T. pusillus*;
- Os caracteres bula timpânica robusta, forame palatal postero-lateral grande, fenestra palatina pequena, e tamanho da cauda menor que o tamanho do corpo foram suficientes para identificar *T. karimii*;
- Os caracteres bula timpânica pequena, forame palatal postero-lateral pequeno, fenestra palatina grande e tamanho da cauda maior que o tamanho do corpo foram suficientes para identificar *T. macrurus*;
- *Thylamys karimii* e *T. venustus* possuem o mesmo $2n=14$ e $NF=20$.
- O cariótipo do gênero *Thylamys* é conservado, variações do NF são resultantes de diferentes interpretações da morfologia do par de cromossomos acrocêntricos pelos diferentes autores;
- O gênero *Thylamys* é monofilético, assim como cada espécie do gênero analisada com mais de um exemplar;
- Mares epicontinentais formados no Mioceno médio podem ter influenciado a dispersão de *T. karimii* e *T. velutinus* em direção ao Brasil;
- As análises de tempo de divergência sugerem que a radiação de *T. macrurus* foi anterior à radiação de *T. karimii* e *T. velutinus*;

- O restante das espécies de *Thylamys*, em sua maioria, podem ter radiado no plio-pleistoceno por volta de 5 milhões de anos.
- É necessário um maior número amostral das espécies de *T. karimii*, *T. velutinus* e *T. macrurus* para melhor compreender a divergência entre essas espécies;

8 Referências

Ab'Sáber AN. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. Primeira aproximação. Geomorfologia. 1977;52:1-24.

Andreazzi AS, Radermarker V, Gentile R, Herrera HM, Jansen AM, D'Andrea PS. Population ecology of small rodents and marsupials in a semi-deciduous tropical Forest of the southeast Pantanal, Brazil. Zoologia. 2011;28(6):762-770.

Akaike, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov and F. Csaki (Eds.), Second international symposium on information theory. Budapest: Academiai Kiado. 1973: 267-281.

Altekar G, Dwarkadas S, Huelsenbeck JP, Ronquist F. Parallel Metropolis coupled Markov chain Monte Carlo for Bayesian phylogenetic inference. Bioinformatics. 2004;20(3):407-415.

Andreazzi CS, Rademaker V, Gentile R, Herrera HM, Jansen AM, D'Andrea PS. Population ecology of small rodents and marsupials in a semi-deciduous tropical forest of the southeast Pantanal, Brazil. Zoologia. 2011;28(6): 762–770.

Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Systematic Biology. 2006;55:539-552.

Astúa D & Leiner NO. Tooth eruption sequence and replacement pattern in woolly opossums, genus *Caluromys* (Didelphimorphia: Didelphidae). Journal of Mammalogy. 2008;89(1):244-251.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Molecular Biology and Evolution. 1999;16(1):37-48.

Bonvicino CR, Lemos B, Weskler M. Small mammals of Chapada dos Veadeiros national park (Cerrado of central Brazil): Ecologic, karyologic, and taxonomic considerations. Brazilian Journal of Biology. 2005;65(3):395-406.

Braun Jk, Van Den Bussche RA, Morton PK, Mares MA. Phylogenetic and biogeographic relationships of mouse opossums *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) in Southern South America. Journal of Mammalogy. 2005;86(1):147–159.

Braun JK, Pratt NL, Mares MA. *Thylamys pallidior* (Didelphimorphia: Didelphidae). Mammalian Species. 2010;42(856):90-98.

Cabrera AL, Willink A. Biogeografia de America Latina. Serie Biologia, monografia n°. 13. Secretaria Geral da Organização dos estados Americanos, Waghington, DC. 1973:120.

Cáceres NC (Org.). Os marsupias do Brasil: Biologia, ecologia e conserva o. 2^a edi o. Campo Grande, MS. Editora UFMS. 2012.

Cáceres NC, Napoli RP, Lopes WH, Casella J, Gazeta GS. Natural history of the marsupial *Thylamys macrurus* (Mammalia, Didelphidae) in fragments of savannah in southwestern Brazil. Journal of Natural History. 2007; 41:1979-1988.

Cáceres NC, Casella J, Vargas CF, Prates LZ, Tombini AAM, Goulat CS, Lopes WH. Distribu o geográfica de pequenos mamíferos não voadores nas bacias dos rios Araguaia e Paraná, região centro-sul do Brasil. Iheringia, Série Zoologia. 2008;98(2):173-180.

Carmignotto AP, Monfort T. Taxonomy and distribution of the Brazilian species of *Thylamys* (Didelphimorphia: Didelphidae). Mammalia. 2006;70:126-144.

Carvalho BA, Oliveira LFB, Langguth A, Freygang CC, Ferraz RS, Mattevi MS. Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (Didelphimorphia: Didelphidae). American society of mammalogists. 2011;92(1):121-133.

Carvalho BA, Oliveira LFB, Mattevi MS. Phylogeny of *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) species, with special reference to *Thylamys karimii*. Iheringia, Série zoological. 2009;99(4):419-425.

Carvalho BA, Oliveira LFB, Nunes AP, Mattevi MS. Karyotypes of nineteen marsupial species from Brazil. Journal of Mammalogists. 2002;83(1):58-70.

Casado F, Bonvicino CR, Nagle C, Comas B, Manzur TD, Lahoz MM, Seu nez HN. Mitochondrial divergence between 2 populations of the Hooded Capuchin, *Cebus (Sapajus) cay* (Platyrrhini, Primates). Journal of Heredity. 2010; 101:261–269.

Cassens I, Vicario S, Waddell VG, Balchowsky H, Belle DV, Ding W, Fan C, Mohan RSL, Sim es-Lopes PC, Bastida R, Meyes A, Stanhope MJ, Milinkovitch MC. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. PNAS. 2000;97(21):11343-11347.

Creighton GK. Systematic studies on opossums (Didelphidae) and rodents (Cricetidae). PhD dissertation, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. 1984.

Crisci JV, Kantinas L, Posadas P. Historical Biogeography. Na introduction. Cambridge: Harvard University Press. 2003: 250p.

Colli GR. As origens e a diversificação da herpetofauna do Cerrado. In Scariot A, Souza-Silva JC, Felfili JM (eds). Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília: Ministério do Meio Ambiente. 2005;cap.14:249-264.

Deakin JE, Delbridge ML, Koina E, Harley N, Alsop AE, Wang C, Patel VS, Graves JAM. Reconstruction of the ancestral marsupial karyotype from comparative gene maps. *Evolutionary Biology*. 2013;13:258.

Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *Plos Biology*. 2006;4:1-88.

Drummond AJ, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*. 2007;7:1-214.

Emmons LH, Feer F. Neotropical rainforest mammals, A field guide. 2^o ed. Chicago: The University of Chicago Press. 1997.

Faria MB, Nascimento FF, Oliveira JA, Bonvicino CR. Biogeographic determinants of genetic diversification in the mouse opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity*. 2013;104(5):613-626.

Fernandez-Donoso R, Berrios S, Pincheira J. Position of the nucleolus within the nuclei of pachytene spermatocytes of *Dromiciops australis* and *Marmosa elegans* (Didelphoidea-Marsupialia). *Experientia*. 1979;(35):1021-1023.

Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YRL, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers on Conservation Biology*. 1996;4:1-38.

Gardner A L. Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. 2007;1:41-42.

Gardner A L, Creighton G K. "A new generic name for Tate's (1933) microtarsus group of South American mouse opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. 1989;102(1):3-7.

Giarla TC, Voss RS, Jansa SA. Hidden diversity in the Andes: comparison of species delimitation methods in montane marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014;70:137-151.

Giarla TC & Jansa SA. The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recent radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). *Journal of Biogeography*. 2014;41:1547-1558.

Giarla TC, Voss RS, Jansa SA. Species limits and phylogenetic relationships in the didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *American Museum of Natural History*. 2010;(346):1-67.

Gilmore RM. Zoology, in the susceptibility to yellow fever of the vertebrates of eastern Colombia I, Marsupialis. 1941.

Godinho AL, Godinho HP. Breve visão do São Francisco. In: Godinho A.L., Godinho, H.P., editores. As águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte, MG: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. 2003:15–24.

Goin FJ, Montalvo CI, Visconti G. Los marsupials (Mammalia) del Mioceno superior de la Formacion Cerro Azul (Provincia de La Pampa, Argentina). Estudios Geologicos. 2000;56:101–126.

Goin FJ. *Thylamys zettii*, una nueva especie de marmosino (Marsupialia, Didelphidae) del Cenozoico de la region pampeana. Ameghiniana. 1997;34:481–484.

Guindon S, Gascuel O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate larges phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology. 2003;52:696-704.

Huelsenbeck JP, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics. 2001;17:754–755.

Jansa SA, Baker FK, Voss RS. The early diversification history of didelphid marsupials: A window into South America's "splendid isolation". Evolution. 2013;68(3):684-695.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. Evolution of cytochrome b gene of mammals. Journal Molecular Evolution. 1991;32:128-144.

Keane TM, Creevey CJ, Pentony MM, naughton TJ, McInerney JO. Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that ad hoc assumptions for choice of matrix are not justified. BMC Evolutionary Biology. 2006;6:29.

Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution. 1980;16:111-120.

Lavina EL, Fauth G. Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos. In: Carvalho CJB, Almeida EAB. Biogeografia da América do Sul: padrões e processos. Editora Roca. 2013.

Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics. 2009;25:1451-1452.

Marshall L & Lundberg J. Technical comments. Science. 1996;273:124p.

Mccarthy C. Chromas 1.45. School of Health Science, Griffith University, Southport, Queensland, Australia. 1998.

Marshall LG. Systematics of Itaboraian (middle Paleocene) age “opossum– like” marsupials from the limestone quarry at São Jose de Itaboraí, Brazil. *Possums and opossums: studies in evolution*. 1987;1:91-160.

Marshall L & Lundberg J. Technical comments. *Science*. 1996; 16:124p.
Martin GM. Sobre la identidad de *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) del oeste pampeano y centro-sur del Espinal, Argentina. *Mastozoología Neotropical*. 2009;16(2):33-346.

Melo GL, Sponchiado J. Distribuição geográfica dos marsupiais no Brasil. In: Cáceres NC (Organizador). *Os marsupiais do Brasil: Biologia, ecología e conservação*. 2ª edição. Campo Grande, MS. Editora UFMS. 2012;93-110.

Menezes AN, Bonvicino CR, Seuánez HN. Identification, classification and evolution of Owl Monkeys (*Aotus*, Illiger 1811). *BMC Evolutionary Biology*. 2010;10:248.

Mones A. sobre una colección de vertebrados fosiles de Monte Hermoso (plioceno superior), Argentina, com la descripción de una nueva especie de Marmosa (Marsupialia: Didelphidae). *Comunicaciones Paleontológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*. 1980;1(8):159-170.

Page J, Barríos S, Rufas JS, Parra MT, Suja JA, Heyting C, Fernández-Donoso R. The pairing of x and y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by dense plate developed from their axial elements. *Journal of Cell Science*. 2003;116:551-560

Palma RE. Range expansion of two South American mouse opossums (*Thylamys*, Didelphidae) and their biogeographic implications. *Revista Chilena de Historia Natural*. 1995;68:515-522.

Palma RE & Yates TL. The chromosomes of Bolivian didelphid marsupials. *Occasional Papers of the Museum of Texas Tech University*. 1996;162:1-20.

Palma ART & Vieira EM. O gênero *Thylamys*: Avanços e lacunas no conhecimento. Cap. 12. In: Cáceres NC (Organizador). *Os marsupiais do Brasil: biologia, ecología e conservação*. 2ª edição, Campo Grande, Editora UFMS. 2012;

Palma RE, Boric-Bargetto D, Jayat JP, Flores DA, Zeballos H, Pacheco V, Cancino RA, Alfaro FD, Rodríguez-Serrano E, Pardinas UFJ. Molecular phylogenetics of mouse opossums: new findings on the phylogeny of *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Zoologica Scripta*. 2014;43(3):217-234.

Paresque R, de Souza WP, Mendes SL, Fagundes V. composição cariotípica da fauna de roedores e marsupiais de duas áreas de mata Atlântica do Espírito Santo, Brasil. *Boletim do Museu de Biologia Mello Leitão*. 2004;17:5-33.

Pascual R. Late cretaceous-recent land-mammals and approach to South American geobiotic evolution. *Mastozoología Neotropical*. 1996;3(2):133-152.

Pascual R, Ortiz-Jaureguizar E. The Gondwanan and South American episodes: two major and unrelated moments in the history of South American mammals. *Journal of Mammalian Evolution* 2007;14:75-137.

Platnick NI & Nelson G. A method for historical biogeography. *Biogeography*.1977;1-16

Posada D & Crandall KA. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*. 2001; 50(4): 580-601.

Posadas P & Ortiz-Jaureguizar E. Evolução da região Andina da América do Sul. Cap. 11. In: Carvalho CJB & Almeida EAB. (eds.). *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Processos*. São Paulo, Roca. 2013.

Quadros J, Monteiro-Filho EL. Revisão conceitual, padrões microestruturais e proposta nomenclatória para os pelos-guarda de mamíferos brasileiros. *Revista Brasileira de Zoologia*. 2006;23(1):274-278.

Rambaut A, Suchard MA, Xie D & Drummond AJ Tracer v1.6. 2014. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Reig O, Kirsch J, Marshall L. Systematics relationships of the living and neocenoic American "opossum like" marsupials (suborder Didelphimorphia), with comments on the classification on these and of the Cretaceous and Paleogene New World and European metatherians. In: *Possums and Opossums: Studies in evolution*. 1987:1-89.

Reig OA, Gardner AL, Bianchi NO, Patton JL. The chromosomes of the Didelphidae (Marsupialia) and their evolutionary significance. *Biological Journal of the Linnean Society*. 1977;9:191-216.

Reig OA, Fernandez-Donoso R, Spotorno A. Further occurrence of a 2N = 14 chromosomes karyotype in two species of Chilean didelphid marsupials. *Zeitschrift für Säugetierkunde*. 1972;37:37-42.

Reig OA, Bianchi NO. The occurrence of an intermediate didelphid karyotype in the short-tailed opossum (genus *Monodelphis*). *Experientia*. 1969;25:1210-1211.

Rodríguez F, Oliver JL, Marín A, Medina JR. The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*. 1990;142(4):485-501.

Rossi VR, Bianconi VG, Carmignotto AP, Miranda CL. Mamíferos do Brasil In: Reis RN, Peracchi LA, Pedro AW, Lima PI. (Eds). *Ordem Didelphimorphia*. Edifurb, Londrina, Brasil. 2010:27-66.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(2):589-600.

Shchipanov NA, Isayev SI Aniskin VM. On the biology of mouse opossum *Thylamys elegans* (Didelphidae, Marsupialia) in the province of Tarija (Bolivia). *Zoologicheskii Zhurnal*. 1996;751: 75-87.

Simpson GG. History of the fauna of Latin America. Sigma Xi, The scientific society. 1950;38(3):361-389.

Sportono AE, Marín JC, Yévenes M, Walkr LI, Fernández-Donoso R, Pincheira J, *et al.* *Journal of Mammalian Evolution*. 1997;4(4):259-269.

Svartman M & Vianna-Morgante AM. Conservation of chromosomal location of nucleolus organizer in American marsupials (Didelphidae). *Genetica*. 2003;118:11-16.

Svartman M. American marsupials chromosomes: Why study them? *Genetics and Molecular Biology*. 2009;32(4):675-687.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.

Solari S. Diversity and distribution of *Thylamys* (Didelphidae) in South America, with emphasis on species from Western side of teh Andes, Chapter 6 in: Jones M, Archer M, Dickman C. *Predators with pouches: The biology of carnivorous marsupials*. 2003 .

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipiski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013;30(12):2725-2729.

Tamura K, Kumar S. Evolutionary distance estimation under heterogeneous substitution pattern among lineages. *Molecular Biology Evolution*. 2002;19:1727–1736.

Tate GHH. A systematic revision of yhe marsupial genus *Marmosa* with a discussion of the adaptive radiation of the murine opossums (*Marmosa*). *Bulletin of the American Museum os Natural History*. 1933;66:1-250.

Teta P, D'Élia G, Flores D, Sancha NL. Diversity and distribution of themouse opossums of the genus *Thylamys* (Didephimorphia, Didelphidae) in northeastern and central Argentina. *Gayana*. 2009;73(2):180-190.

Tribe CJ. Dental age classes in *Marmosa incana* and other didelphoids. *Journal of Mammalogy*. 1990;. 71:566–569.

Udvardy MD, Udvardy MDF. A classification of the biogeographical provinces of the world (Projeto no.8). IUCN occasional paper, no.18. Morges, Switzerland: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. 1975.

Vieira EM, Palma ART. Natural history of *Thylamys velutinus* (Marsupialia, Didelphidae) in central Brazil. *Mammalian*. 1996;60(3):481-484.

Vilela JF, Oliveira JA, Russo CAM. The diversification of the genus *Monodelphis* and the chronology of Didelphidae (Didelphimorphia). *Zoological Journal of Linnean Society*. 2015.

Voss RS, Jansa SA. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *American Museum of Natural History*. 2009;322:1–177.

Wilson DE, Reeder DM. *Mammal Species of the World. A taxonomic and Geographic Reference*, 3rd. ed. 2005.

Zanella FCV. Evolução da biota da diagonal de formações abertas secas da América do Sul. Cap 13. In: Carvalho CJB & Almeida EAB. (eds.). *Biogeografia da América do Sul: Padrões e Porcessos*. São Paulo, Roca. 2013.



Anexo I.

Protocolo para extração de DNA pelo método de fenol/clorofórmio.

1ª Parte:

Cortar o tecido com bisturi e macerar bastante;

Acrescentar 500mL de tampão de lise (100mM NaCl; 10mM TRIS pH7,5), 50mL de SDS 10%, 2mL de RNase e 4mL de Proteinase XIV;

Deixar em uma temperatura de 37 °C por aproximadamente 12 horas.

2ª Parte:

Adicionar no mesmo tubo o mesmo volume de fenol (aprox. 400 μ L). Vortexar e centrifugar por 10 minutos a 13000rpm;

Retirar o sobrenadante e passar para outro tubo de microcentrífuga;

Adicionar 400 μ L de fenol-clorofórmio. Vortexar e centrifugar por 10 minutos a 13000rpm;

Retirar o sobrenadante e passar para outro tubo de microcentrífuga;

Adicionar o mesmo volume de clorofórmio. Vortexar e centrifugar por 10 minutos a 13200rpm;

Retirar o sobrenadante e passar para outro tubo de microcentrífuga;

Adicionar 800 μ L de etanol absoluto gelado. Centrifugar a 13000rpm por 20 minutos;

Descartar o etanol e adicionar 200 μ L de etanol 70%. Centrifugar a 13200rpm por 10 minutos;

Retirar o etanol 70% com a pipeta com cuidado para não tirar o pellet;

Secar o DNA na estufa a 37°C com os tubos abertos;

Adicionar de 30 a 50mL de H₂O estéril.

Anexo II

Recomendações para o preparo das amostras para sequenciamento na plataforma abi 3130x/

I - Quantificar o *template* com base nos valores recomendados pela Applied Biosystems:

Quadro 1 - Quantidade de template recomendada para reação de sequenciamento no ABI 3130 xl

Template	Quantidade
Produto de PCR: 100-200bp	1-3ng
200-500bp	3-10ng
500-1000bp	5-20ng
1000-2000bp	10-40ng
>2000bp	40-100ng
DNA fita simples	50-100ng
DNA dupla fita	200-500ng
Cosmídeo/BAC	0,5-1µg
DNA genômico bacteriano	2-3µg

II - Montar as reações de sequenciamento, totalizando o volume final de 10 µL, utilizando como referência o seguinte protocolo:

Quadro 2 – Quantidades recomendadas para montagem da reação de sequenciamento com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1

Reagente	Quantidade (por reação)
Ready Reaction Kit	1 µL
BigDye Sequencing Buffer (5X)	1,5 µL
Primer (senso ou antisenso)	3,2 pmol
Template	Ver Quadro 1
Água deionizada	q.s.p.
Volume final	10 µL

IMPORTANTE: Para o preparo da reação controle (pGEM), utilizar os seguintes volumes:

Reagente	Quantidade (por reação)
Ready Reaction Kit	1 µL
BigDye Sequencing Buffer (5X)	1,5 µL
<i>Primer</i> M13	4,0 µL
pGEM	1,5 µL
Água deionizada	2 µL
Volume final	10 µL

OBSERVAÇÕES: (1) Montar a reação controle (pGEM) preferencialmente no poço H12; (2) O *primer* M13 e o pGEM são fornecidos juntamente com o kit de sequenciamento (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1).

III – Preparar as reações utilizando a seguinte ciclagem básica:

Quadro 3 – **Ciclagem básica para reação de sequenciamento com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1**

Protocolo Básico:		
Inicial	96°C	1 min
Denaturação	96°C	15 seg
Anelamento	50°C	15 seg
Extensão	60°C	4 min
		} 25-40 ciclos
Final	4-8 °C	Infinito
•Importante configurar o termociclador para uma rampa de 1 °/seg para facilitar o anelamento do primer.		

IV – Precipitar as reações de sequenciamento seguindo um dos protocolos (Precipitação por Etanol/EDTA; Purificação por Etanol/EDTA/Acetato de Sódio; BigDye X Terminator Purification Kit) descritos no “DNA Sequencing by

Capillary Electrophoresis. Applied Biosystems Chemistry Guide. Second Edition” (Part Number 4305080 Rev. C 05/2009).

Alternativamente, pode ser realizada a precipitação por Etanol/Isopropanol, seguindo o protocolo utilizado na Plataforma de Sequenciamento e Análise de Fragmentos PDTIS/Fiocruz, descrito abaixo.

ETAPA	Precipitação da Reação de Sequenciamento (Etanol/Isopropanol)
1	Centrifugar a 600 rpm por 1 minuto (“Spin”).
2	Adicionar 30 µL de Isopropanol 75% (Merck).
3	Ressuspender as amostras, com a pipeta, 3 a 4 vezes, para homogeneizá-las. Alternativamente, pode ser utilizado o vórtex.
4	Incubar a placa, por 15 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.
5	Centrifugar, a 4°C, por 45 minutos, a 4.000 rpm.
6	Descartar o sobrenadante vertendo a placa sobre papel-toalha, através de movimentos circulares, apoiada sobre uma bancada.
7	Centrifugar a placa invertida sobre papel-toalha (“spin down”), a 600 rpm, por 1 minuto.
8	Adicionar 50 µL de Etanol 75% (Merck).
9	Centrifugar, a 4°C, por 15 minutos, a 4.000 rpm.
10	Descartar o sobrenadante usando papel-toalha, de acordo como descrito anteriormente.
11	Centrifugar a placa invertida sobre papel-toalha (“spin down”), a 600 rpm, por 1 minuto.
12	Colocar a placa em um bloco aquecido a 60°C, por 10 minutos, ao abrigo da luz.

IMPORTANTE: Quando mantidas a –20°C, devidamente seladas e protegidas da luz, as placas precipitadas poderão ser armazenadas por até 30 dias.